Aus dem Max-Planck-Institut für Systemphysiologie
in Dortmund
Direktor: Professor Dr. med. D. W. Lübbers

Untersuchungen zur quantitativen photometrischen Analyse der Redox-Zustände der Atmungskette in vitro und in vivo am Beispiel des Gehirns

Dissertation
zur
Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

der
Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von
Ulrike Heinrich
aus Frankfurt am Main

Bochum 1981

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544708_0034

Aus dem Max-Planck-Institut für Systemphysiologie
in Dortmund
Direktor: Professor Dr. med. D.W. Lübbers

Untersuchungen zur quantitativen photometrischen Analyse der Redox-Zustände der Atmungskette in vitro und in vivo am Beispiel des Gehirns

Dissertation
zur
Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

der
Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von
Ulrike Heinrich
aus Frankfurt am Main

Bochum 1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

I N H A L T

A.	EINLEITUNG	1
A.1.	Allgemeine Grundlagen	1
A.2.	Einführung in die Problemstellung	4
B.	MATERIAL UND METHODEN	7
B.1.	Material	7
B.1.1.	Chemikalien	7
B.1.2.	Organe	8
B.2.	Methoden	9
B.2.1.	Präparationen	9
B.2.1.1.	Homogenate aus Meerschweinchengehirnen	9
B.2.1.2.	Mitochondrien aus Meerschweinchengehirnen ...	10
B.2.1.3.	Gehirnperfusionen	10
B.2.1.4.	Herstellung von Polyacrylamidkapseln	12
B.2.1.5.	Isolierung von reiner Cytochrom-c-Oxidase (Buse)	13
B.2.1.6.	Isolierung von reinem Cytochrom b, b/c_1, c_1 (Jagow)	14
B.2.1.7.	Herstellung von Hämoglobin aus Meerschweinchenblut	14
B.2.2.	Darstellungen	15
B.2.2.1.	Histologische Auswertungen	15
B.2.2.2.	Elektronenmikroskopische Auswertungen	15
B.2.2.3.	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen	16
B.2.2.4.	Proteinbestimmungen	17
B.2.2.5.	Überprüfung der Güte der Mitochondrien	17
B.2.2.6.	Bestimmung der Cytochromkonzentrationen	19

B.2.3. Photometrische Bestimmungen am Rapidspektrometer 19
B.2.3.1. Messungen in klaren Lösungen 19
B.2.3.2. Streuungsmessungen 20
B.2.3.2.1. Eichreihen mit reinem Hämoglobin 21
B.2.3.2.2. Hämoglobineichreihen mit Polyacrylamidkapseln 22
B.2.3.2.3. Hämoglobineichreihen mit Gehirnmitochondrien 22
B.2.3.2.4. Hämoglobineichreihen mit Gehirnhomogenaten .. 23

B.2.3.3. Aufnahmen von biologischen Komponenten 23
B.2.3.3.1. Gehirnmitochondrienspektren 23
B.2.3.3.2. Gehirnhomogenatspektren 25
B.2.3.3.3. Gehirnschnittspektren 25
B.2.3.4. Organspektren 26
B.2.3.4.1. Messungen am perfundierten Meerschweinchengehirn 26

B.2.4. Mathematische Auswertmethoden 27
B.2.4.1. Transmissions- und Reflexionsphotometrie 27
B.2.4.2. Auswertung der Organspektren 35

C. ERGEBNISSE 40

C.1. Ergebnisse der Darstellungen 40
C.1.1. Histologische und elektronenmikroskopische Untersuchungen 40

C.1.2. Güte der Mitochondrien 44

C.1.3. Cytochromkonzentrationen 46

C.2. Photometrische Bestimmungen am Rapidspektrometer 48

C.2.1.	Messungen in klaren Lösungen	50
C.2.1.1.	Reine Cytochromspektren	50
C.2.1.2.	Hämoglobin und Myoglobin	57
C.2.2.	Streuungsmessungen	60
C.2.2.1.	Eichreihen mit reinem Hämoglobin	61
C.2.2.2.	Hämoglobineichreihen mit Polyacrylamid-kapseln	62
C.2.2.3.	Hämoglobineichreihen mit Gehirnmitochondrien	72
C.2.2.4.	Hämoglobineichreihen mit Gehirnhomogenaten	75
C.2.3.	Aufnahmen von biologischen Komponenten	78
C.2.3.1.	Gehirnmitochondrienspektren	78
C.2.3.2.	Gehirnhomogenatspektren	88
C.2.3.3.	Gehirnschnittspektren	92
C.2.4.	Organspektren	94
C.2.4.1.	Gehirnperfusionen	94
D.	DISKUSSION	102
E.	ZUSAMMENFASSUNG	110
E.1.	Untersuchungen an klaren Lösungen	110
E.2.	Untersuchungen an Gehirnmitochondrien	111
E.3.	Untersuchungen an Gehirnhomogenaten	111
E.4.	Simulierte Modellspektren mit Polyacrylamidkapseln	111
E.5.	Untersuchungen am perfundierten Meerschweinchengehirn	112
F.	LITERATURVERZEICHNIS	113

A. EINLEITUNG

A.1. Allgemeine Grundlagen

Der Intermediärstoffwechsel stellt ein Geschehen dar, innerhalb dessen Multienzymsysteme unter Austausch von Materie und Energie zwischen der Zelle und ihrer Umgebung zusammenwirken. Der Stoffwechsel erfüllt dabei vier spezifische Funktionen:

1. Die Gewinnung chemischer Energie, z,B. aus organischen Nährstoffen oder aus dem Sonnenlicht.

2. Die Umwandlung der Nährstoffe in Bausteine der makromolekularen Zellkomponenten.

3. Die Eingliederung dieser Bausteine in Proteine, Nukleinsäuren, Lipide und andere Zellbestandteile.

4. Die Bildung sowie den Abbau der für spezielle Zellfunktionen benötigten Biomoleküle.

Zellen können in zwei große Gruppen eingeteilt werden, je nach der chemischen Form, in der sie den Kohlenstoff aus der Umgebung aufnehmen. Autotrophe Zellen können Kohlendioxid als einzige Kohlenstoffquellen verwenden und daraus ihre C-haltigen Biomoleküle aufbauen. Heterotrophe Zellen dagegen können Kohlendioxid nicht nutzen und müssen Kohlenstoff in relativ kompliziert gebundener Form, z.B. als Glucose, aus ihrer Umgebung beziehen.

Eine weitere Einteilungsmöglichkeit ergibt sich aus der Art der Energiequellen.
Zellen, die Licht als Energiequelle verwenden, werden als phototroph, andere, die auf Redoxreaktionen angewiesen sind, als chemotroph bezeichnet.

In der vorliegenden Arbeit wurden solche Redoxreaktionen in Zellkompartimenten (Mitochondrien), Zellhomogenaten und schließlich im intakten Gewebe studiert.

Die entscheidenden energieliefernden Reaktionen solcher chemotropher Zellen finden in den Mitochondrien statt. Es sind die mit am besten untersuchten Strukturelemente der Zelle. Sie besitzen zwei durchgehende Membransysteme. Die äußere Membran ist glatt, während die innere in zahlreiche Falten, die sogenannten Cristae, nach innen eingebuchtet ist. Mitochondrien aus sehr atmungsaktiven Geweben haben besonders viele Cristae, die fast das ganze innere Kompartiment ausfüllen können. Der Innenraum der Mitochondrien enthält ein halbflüssiges Medium, die Matrix.

Die äußere Membran ist für die meisten kleineren Moleküle frei permeabel, während die innere Membran selektiv permeabel ist (Transport durch Carrier entweder nur aus einer Richtung oder im Gegenaustausch oder auch freie Diffusion, wie z.B. Pyruvat).

Untersuchungen über die Beziehung zwischen der Struktur der Mitochondrien und ihrer Funktion haben zu wichtigen Erkenntnissen geführt (1 - 8). Es hat sich gezeigt, daß die Enzyme des Citronensäurezyklus im inneren Kompartiment des Mitochondriums, der Matrix, sitzen, während die Enzyme der Atmungskette ausschließlich in der inneren Membran lokalisiert sind. Es gilt weiterhin als ziemlich sicher, daß die Cytochrome in der Membran exakt in der Reihenfolge, in der sie miteinander reagieren, hintereinander angeordnet sind. Eine solche Gruppe von Cytochromen, zusammen mit den Flavoproteinen, die dem Cytochromsystem vorgeschaltet sind, bezeichnet man als "Atmungsgruppe". Die Atmungsgruppen sind in der inneren Membran in regelmäßigen Abständen von etwa 200 Å zu finden.

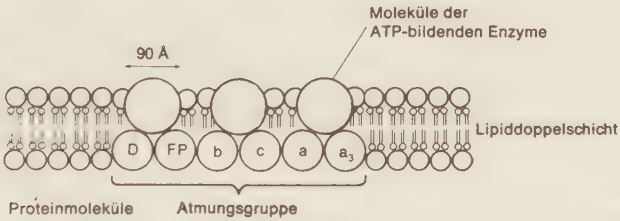


Abb. 1: Schematische Darstellung einer Atmungsgruppe in der inneren Membran eines Mitochondriums (nach Lehninger).

Die ATP-bildenden Enzyme haben verhältnismäßig hohe Molekulargewichte und sind direkt an ihren Wirkungsorten angeordnet.

Für die oxidative Phosphorylierung, d.h., für die Umwandlung der bei dem Elektronentransport freiwerdenden Energie in Phosphatbindungsenergie, ist eine völlig intakte innere Mitochondrienmembran notwendig.

Der genaue Mechanismus der ATP-Produktion beim Elektronentransport ist noch immer unbekannt.

Die zunächst postulierte Theorie der chemischen Kopplung geht von energiereich gebundenen Zwischenprodukten aus und basiert auf charakteristischen Wirkungen von 2,4-Dinitrophenol und Oligomycin, auf Teilreaktionen oder Einzelschritten des Prozesses (9, 10). Da jedoch niemals diese energiereichen Zwischenprodukte identifiziert werden konnten, wird heute die chemiosmotische Theorie von Mitchell (11-14) vorgezogen.

Mitchell's Modell nimmt an, daß beim Elektronentransport Protonen durch die Membran gepumpt werden und der in dieser Weise geschaffene H^+-Ionengradient die Triebkraft für die ATP-Synthese bildet.

Die dritte Hypothese, die als Konformations-Hypothese bezeichnet wird, geht davon aus, daß der Elektronentransport mit Konformationsänderungen in der Mitochondrienmembran verbunden ist, durch die eine Phosphorylierung von ADP ermöglicht wird (15).
Die Atmungskette bildet den gemeinsamen Weg, über den alle aus den verschiedensten Nährstoffen der Zelle stammenden Elektronen auf den Sauerstoff übertragen werden. In der aeroben Zelle ist der molekulare Sauerstoff der letzte Elektronenakzeptor.

A.2. Einführung in die Problemstellung

Mit Hilfe der Photometrie lassen sich Redoxzustände der Cytochrome der Atmungskette messen.
Die Redoxzustände der Atmungskette sowie ihre Kinetiken erlauben Rückschlüsse auf die Aktivität der Atmungskette und diese wiederum ist Bestandteil der Regulation des Energiestoffwechsels. Photometrische Untersuchungen am Organ bieten den großen Vorteil, daß kein verletzender Eingriff - wie zum

Beispiel durch Stichelektroden - an dem Gewebe vorgenommen werden muß. Durch diese nicht-invasive Methode ist der physiologische Zustand des Untersuchungsobjeks gewährleistet. In der vorliegenden Arbeit sollte anhand von systematischen Untersuchungen eine quantitative Analyse photometrischer Messungen der Redoxzustände der Atmungskette in vitro und in vivo bearbeitet werden. Da wegen der Streuung des Lichtes und der inhomogenen Lichtwegverteilung eine Auswertung nach dem Bouguer - Lambert - Beerschen Gesetz nicht angewandt werden kann, wurde ein anderes Auswertungsverfahren, die Zwei-Fluß-Theorie nach Kubelka und Munk (42, 43) auf seine Anwendbarkeit geprüft.
Dazu wurde in Modelluntersuchungen in vitro die komplizierten Verhältnisse in vivo schrittweise angenähert.

Die in vitro Versuche bestanden aus Messungen in
- klaren Lösungen (Cytochromen)
- synthetischen Polyacrylamidkapselsuspensionen
- Mitochondriensuspensionen vom Meerschweinchengehirn
- Homogenatsuspensionen vom Meerschweinchengehirn
- Gehirnschnitten.

Die in vivo Messungen wurden am hämoglobinfrei perfundierten Meerschweinchengehirn durchgeführt. Durch die Perfusion konnten die Cytochromspektren ohne Überlagerung des störenden Hämoglobinspektrums dargestellt werden.
Die Modelluntersuchungen ergaben, daß sich das wahre Absorptionsspektrum und das Streuspektrum mit der Zwei-Fluß-Theorie von Kubelka und Munk (42, 43) bestimmen lassen, wenn von der gleichen Probe ein Spektrenpaar gemessen wird, das aus Transmissions- und Reflexionsspektrum besteht.
Um eine solche Auswertung zu ermöglichen mußte die Zwei-Fluß-Theorie dieser speziellen Fragestellung angepaßt werden.

Die in vivo Messungen entsprechen Proben unendlicher Schichtdicke. Da sich in vivo keine Transmissionsspektren messen lassen, wurde in diesem Fall versucht, das Spektrenpaar

aus Reflexionsspektrum und wahrem Absorptionsspektrum der Cytochrome in Lösung zu bilden. Auch dieses Verfahren führte zum Erfolg.

Es ergab sich, daß das hämoglobinfrei perfundierte Gehirn sehr gute Voraussetzungen für die Reflexionsphotometrie hat, da die Streuung in dem untersuchten Wellenlängenbereich praktisch konstant ist. In einem solchen Falle lassen sich die Redoxzustände der einzelnen Komponenten der Atmungskette durch eine lineare Mehrkomponentenanalyse bestimmen.

B. MATERIAL UND METHODEN

B.1. Material

B.1.1. Chemikalien

Folgende Chemikalien wurden bei der Durchführung der Experimente verwandt:

Triäthanolamin-Hydrochlorid
Hersteller: Boehringer, Mannheim

Titriplex III = Äthylendinitrilotetraessigsäure,
Dinatriumsalz (Dihydrat) = Na_2 EDTA
Hersteller: Merck

Cytochrom c aus Pferdeherz
Hersteller: Boehringer, Mannheim

Adenosin-5'-disphosphat
Hersteller: Boehringer, Mannheim

Succinat-Hexahydrat
Hersteller: Sigma

Nembutal (60 mg/ml)
Hersteller: Abott

Liquemin 25000
Hersteller: Hoffmann-La Roche

Atropin
Hersteller: Dr. Thilo, Dortmund

Albumin aus Rinderserum
Hersteller: Serva

Nagarse aus Bacillus subtilis
Hersteller: Serva

Amytal = Äthylisoamylbarbitursäure, Na-Salz
Hersteller: Serva

Natriumdithionit
Hersteller: Merck

Macrodex 6% mit 0,9% NaCl
Hersteller: Knoll AG

Papaverin-Hydrochlorid, 0,04 g
Hersteller: Drobena - Erich Heinze, Berlin

Die übrigen Chemikalien und Reagenzien, die verwandt wurden, entsprachen der Klassifikation p.A. und wurden von Merck, Darmstadt, geliefert.

B.1.2. Organe

Hausmeerschweinchen mit einem Gewicht von 200 - 400 g wurden entblutet, die Schädel geöffnet und die Gehirne entnommen. Diese wurden entweder homogenisiert (B.2.1.1.) oder es wurden

aus ihnen, wie unter B.2.1.2. beschrieben, die Mitochondrien isoliert.
Bei einem weiteren Teil der Meerschweinchen wurde eine in-vivo-Perfusion durchgeführt (B.2.1.3.)

B.2. Methoden

B.2.1. Präparationen

B.2.1.1. Homogenate aus Meerschweinchengehirn

Vor der Präparation erfolgte eine Injektion von 0,5 ml Liquemin 25000 (i.m.) zur Verminderung der Blutgerinnung. Nach ca. 30 min wurden die Tiere getötet, entblutet und die Gehirne entnommen. Jedes Gehirn wurde zunächst 2 mal in physiologischer Kochsalzlösung gespült, um möglichst viel Hämoglobin herauszuwaschen. Dieser Vorgang dauerte ca. 3 - 5 min. Nun erfolgte ein zweiter Spülgang mit eiskaltem MSE-Puffer (0.225 $mol \cdot l^{-1}$ Mannitol, 0.075 $mol \cdot l^{-1}$ Sucrose und 100 $\mu mol \cdot l^{-1}$ EDTA, pH 7.4) (22).

Jetzt wurde das Gehirn mit der Schere vorzerkleinert und anschließend mit einem Braun-Potter S unter Zusatz von MSE-Puffer (Verdünnung 1:10 w/v) im Eisbad homogenisiert.

Ein Teil des Homogenates wurde für die Proteinbestimmung nach Lowry (B.2.2.4.) entnommen, der Rest wurde für die jeweiligen Versuche eingesetzt.

B.2.1.2. Mitochondrien aus Meerschweinchengehirnen

Die Präparation der Gehirnmitochondrien wurde nach einer von Lena Mela, Department of Surgery, University of Pennsylvania, Philadelphia, USA, entwickelten Methode durchgeführt (23).

Zunächst wurde, wie unter B.2.1.1. beschrieben, ein Gehirnhomogenat hergestellt. Es erfolgte jedoch zusätzlich eine kurze Inkubation in 10 ml MSE-Puffer (0.225 $mol \cdot l^{-1}$ Mannitol, 0.075 $mol \cdot l^{-1}$ Sucrose, 100 $\mu mol \cdot l^{-1}$ EDTA, pH 7.4), dem hierfür 50 mg Albumin und 5 mg Nagarse zugesetzt wurden.

Das auf diese Weise erhaltene Homogenat wurde mit Puffer aufgefüllt und zunächst 7 min bei 755 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand 10 min bei 10800 x g ein weiteres Mal zentrifugiert. Die nun sedimentierende Fraktion enthält die Mitochondrien, ist aber noch relativ stark verunreinigt. Sie wurde in MSE-Puffer resuspendiert und nun 8 min bei 7710 x g zentrifugiert. Dieser zuletzt beschriebene Vorgang muß mindestens drei Mal wiederholt werden, um eine reine Mitochondrienfraktion zu erhalten. Das letzte Pellet wurde vorsichtig mit einem Glasstab homogenisiert und in 1.0 ml MSE-Puffer aufgenommen. Die Proteinbestimmung erfolgte nach Lowry (B.2.2.4.)

B.2.1.3. Gehirnperfusionen

Die Perfusionsapparatur umfaßt einen Scheibenoxygenator m. Thermostatisierungsmantel, eine Rollenpumpe, ein Steigrohr zur Überprüfung des Perfusionsdruckes, eine Abzweigungsstelle zur direkten Injektion von Pharmaka, eine Luftfalle, einen Bakte-

rienfilter sowie eine Beatmungspumpe (24, 25).
Das Perfusionsmittel bestand aus Macrodex 6% + 20 $nmol \cdot l^{-1}$ $NaHCO_3$ + 4.0 mg/100 ml Papaverinhydrochlorid. Es wurde mittels Methanol auf 18°C gekühlt und im Oxygenator mit Carbogen (95% O_2 - 5% CO_2) begast.

Die Tiere wurden 30 min vor Versuchsbeginn mit 0.5 ml Liquemin vorbehandelt.

Als Narkotikum erwies sich Nembutal (60 mg/ml) in einer Konzentration von 0.1 ml/100 g Tiergewicht mit einer zusätzlichen Gabe von 0.1 ml Atropin (1 mg/ml) als geeignet.

Für die Präparation wurden die Tiere zunächst tracheotomiert und an eine Atmungspumpe angeschlossen. Nun wurde die Schädelkalotte freigelegt und mit dem Bohrer leicht angebohrt. Das Fell über dem Brustbein wurde geöffnet, und die in der Axilla gelegenen Gefäße abgebunden.
Jetzt erfolgte die Eröffnung des Brustkorbes und die Einbindung des Zulaufkatheters in die Bauchaorta. In den folgenden Schritten wurde die A. pulmonalis und die Aorta an der Herzbasis abgebunden und der Ablaufkatheter in der V. cava caudalis fixiert.
Die Atmungspumpe konnte ausgeschaltet werden, sobald die Perfusion zirkulierte.
Das Tier wurde nun in die Bauchlage gewendet und in den Schädel ein rundes Fenster von ca. 5 mm Durchmesser gebohrt. Diese Bohrung muß sehr sorgfältig durchgeführt werden, um jede Schädigung des Gehirns zu vermeiden.
Nach einer Perfusionsdauer von ca. 10 min war das Gehirn hämoglobinfrei perfundiert und die photometrische Überprüfung konnte beginnen.

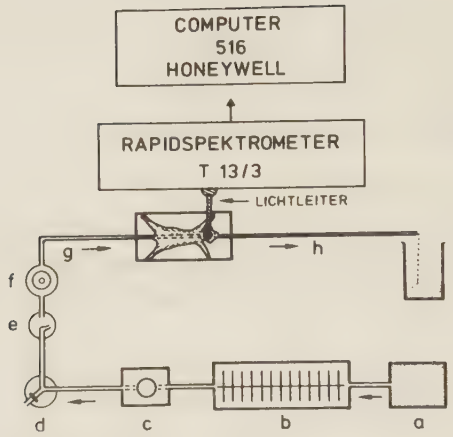


Abb. 2: Schematische Darstellung der Gehirnperfusion und ihrer Registrierung.
a: Perfusionsmedium; B: Oxygenator; c: Pumpe; d: Abzweigungsstelle für die Gabe von Pharmaka; e: Luftfalle; f: Bakterienfilter; g: Zulaufkatheter; h: Ablaufkatheter.

2.1.4. Herstellung von Polyacrylamidkapseln

Zur Durchführung einiger Modellversuche wurden in unserem Hause von Herrn Dr. Opitz und Herrn Steinmann Nano- und Mikrokapseln hergestellt.

Die Nanokapseln von 0.2 /um Durchmesser wurden nach einem von Birrenbach (26) beschriebenen Verfahren hergestellt. Es handelt sich hierbei um ein Solubilisationsverfahren (Bildung der Mizellen) mit anschließender Polymerisation.

Die Herstellung der Mikrokapseln stellt eine Weiterentwicklung des oben genannten Verfahrens dar (27).

Im Gegensatz zur Solubilisation wird hierbei die wässrige Phase mechanisch emulgiert. Die verschiedenen Kapselgrößen von 5/um und 20 - 40 /um Durchmesser erfordern unterschiedliche Konzentrationen des Emulgators und können aufgrund von Änderungen der Rührgeschwindigkeit des Emulgats erreicht werden. Überprüfung und Größenbestimmung der Kapseln erfolgte im Rasterelektronenmikroskop (B.2.2.3.).

B.2.1.5. Isolierung von reiner Cytochrom-c-Oxidase (Buse)

Um die gegenseitige Beeinflussung der Absorptionsbanden der Cytochrome überprüfen zu können, sollten Einzelspektren und Mischspektren von Cytochromen dargestellt werden.

Prof. Dr. G. Buse, Abteilung Physiologische Chemie der Technischen Hochschule Aachen, befaßt sich mit der Präparation und Strukturaufklärung der Cytochrom-c-Oxidase aus Rinderherzmuskeln (28-30). Er war so freundlich, die für diese Versuche benötigten Enzymmengen der höchsten Reinheitsstufe zur Verfügung zu stellen.

B.2.1.6. Isolierung von reinem Cytochrom b, dem b/c_1-Komplex und Cytochrom c_1 (v. Jagow)

In Anlehnung an das unter B.2.1.5. beschriebene Programm, sollte die Cytochrompalette vor allem um Cytochrom b erweitert werden.

Prof. G. von Jagow, Institut für Physiologische Chemie und Physikalische Biochemie der Universität München, arbeitet seit längerer Zeit an der Isolation und Charakerisierung von Cytochrom b aus Rinderherzen (31-34).

Als Nebenprodukte bei der Isolation von Cytochrom b entstehen der Cytochrom b/c_1-Komplex sowie Cytochrom c_1.

Alle drei Cytochromkomponenten wurden von ihm für Messungen am Rapidspektrometer zur Verfügung gestellt.

B.2.1.7. Herstellung von Hämoglobin aus Meerschweinchenblut

Das Blut wurde zunächst bei 4000 Upm zentrifugiert. Der auf diese Weise erhaltene Blutkuchen wurde mehrfach mit eiskalter physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, dazwischen wurde jeweils das Waschwasser abzentrifugiert und entfernt.
Schließlich wurde im Verhältnis 1:1 (w/v) eiskaltes aqua bidest. hinzugefügt, was zum Platzen der Erythrozyten führt und etwa 1 Stunde bei 4°C inkubiert. Danach erfolgte eine weitere Zentrifugation von 1 Stunde bei 15000 Upm.
Die klare Hämoglobinlösung wurde abgehebert und tropfenweise in flüssigen Stickstoff einpipettiert. Es entstehen kleine Hb-Kügelchen, die im flüssigen Stickstoff lange Zeit haltbar sind und jeweils portionsweise für die Versuche eingesetzt werden können.

Die Konzentration des Hämoglobins wurde nach der Cyanid-Methode (35) bestimmt.

B.2.2. Darstellungen

B.2.2.1. Histologische Auswertungen

Meerschweinchengehirnhomogenate (Gewebe in Mannitol-Sucrose-EDTA-Medium + Nagarse + Albumin) und Meerschweinchengehirnmitochondrien (aufgenommen in Mannitol-Sucrose-EDTA-Medium) wurden auf ihre histologische Beschaffenheit untersucht. Von allen Proben wurden Ausstriche hergestellt und nach Pappenheim oder May-Grünwald gefärbt.
Zur Dokumentation wurden schwarz-weiß Aufnahmen der mit der Interferenzkontrast-Optik aufgenommenen Ausstriche vor der Fixierung und Farbaufnahmen der fixierten und gefärbten Ausstriche gemacht.

Im weiteren wurden die Größen der Mitochondrien sowie die Größen der im Homogenat vorkommenden Komponenten bestimmt.

Diese Untersuchungen wurden von Frau Dr. E. Seidl, Zentrales Laboratorium für Histologie, Max-Planck-Institut für Systemphysiologie, Dortmund, durchgeführt.

B.2.2.2. Elektronenmikroskopische Auswertungen

Um die Reinheit und den Zustand der Gehirnmitochondrien nach der Präparation zu bestimmen, wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt.

Zu diesem Zweck wurden Mitochondrienpellets mit Glutaraldehyd fixiert, gewässert, nachfixiert, über Alkohol entwässert und schließlich in einen Epon-Kunstharz eingebettet und bei 50°C und 70°C polymerisiert.
Im weiteren wurden Ultradünnschnitte mittels eines Ultracuts (Hersteller: Reichert) angefertigt und die elektronenmikroskopischen Aufnahmen an einem Elmiskop (Fa. Siemens) erstellt.

Die gleiche Behandlung erfuhren auch die Gehirnhomogenate.

Auf diese Weise konnte man sich ein Bild über die Verteilung der Zellorganellen und Zellfragmente sowie deren Größen und Größenunterschiede machen.

Diese Überprüfungen erfolgten in unserem Hause durch Herrn Dr. D. Schäfer, Zentrales Laboratorium für Ultrastrukturforschung.

B.2.2.3. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen

Die unter B.2.1.4. beschriebenen Polyacrylamidkapseln wurden in einem Siemens-Autoscan-Rasterelektronenmikroskop auf ihre Oberflächenbeschaffenheit und Größe untersucht.

Zu diesem Zweck wurden sie zunächst gefriergetrocknet und anschließend mit Gold besputtert (36). Die Besputterung bietet eine gleichmäßige Verteilung des Goldes auf der Kapseloberfläche und führt die für die Messung am Rasterelektronenmikroskop erforderliche Leitfähigkeit der Kapseln herbei.

Zur Darstellung der in den Versuchen eingesetzten Polyacrylamidkapseln wurden schwarz-weiß Aufnahmen mit eingeblendeten Größenmarkierungen und Verstärkungsfaktoren gemacht.

B.2.2.4. Proteinbestimmung

Die Bestimmung des Proteingehaltes jedes Gehirnhomogenates und jeder Mitochondrienfraktion wurde mittels einer modifizierten Folin-Ciocalten-Reaktion (Lowry 1951) durchgeführt (37).

Zur Aufstellung einer Eichkurve wurden steigende Mengen (0.2 - 1.0 ml) einer 0.01%igen Rinderserum-Albuminlösung mit aqua dest. auf 1.0 ml aufgefüllt, mit jeweils 0.5 ml Reaktionslösung - bestehend aus 1 ml K-NaTartrat x 4 H_2O (4%), 1 ml $CuSO_4$ x 5 H_2O (2%) und 98 ml Na_2CO_3 (4%) - in 0.2 N NaOH 10 min bei 20°C inkubiert.

Nach der Inkubation wurden 0.1 ml Folin-Ciocalten-Reagenz hinzugegeben, weitere 30 min bei 20°C inkubiert und dann gegen einen Leerwert - bestehend aus 1 ml Wasser, 0.5 ml Reaktionslösung und 0.1 ml Folin-Ciocalten-Reagenz -, der die gleiche Vorbehandlung erhalten hatte, bei 578 nm in einem Eppendorf-Photometer 1101 M gemessen und aus den so ermittelten Werten die Eichkurve gezeichnet.

Die gleiche Behandlung erfuhren die 1:10 verdünnten Homogenate und Mitochondrien, von denen auf diese Weise der Proteingehalt bestimmt wurde.

B.2.2.5. Überprüfung der Güte der Mitochondrien

Eine ausreichende Güte der Mitochondrien ist in unserem Problemzusammenhang gegeben, wenn eine gute Strukturerhaltung gewährleistet ist und sich stabile optische Verhältnisse während der Messung herausbilden.

An einem Double-Beam-Spektrometer nach Hess, Kleinhans und Schlüter (38) wurden Kontrollversuche der Mitochondrien direkt nach der Präparation durchgeführt.

Zur Messung der Güte der Mitochondrien wird die Wellenlänge des Absorptionsmaximums sowie die Wellenlänge des isobestischen Punktes für ein bestimmtes Cytochromspektrum eingestellt und ein Spektrum vom vollständig oxidierten bis zum vollständig reduzierten Zustand aufgezeichnet.

Hierzu wurde in die Meßküvette (d = 1 cm) eine Mitochondriensuspension unter Zusatz von 20 /ul 0.2 $mol \cdot l^{-1}$ ADP und 50/ul 1 $mol \cdot l^{-1}$ Succinat pipettiert. Die Küvette wurde dicht verschlossen. Ein Magnetrührer verhindert die Sedimentation der Mitochondrien.

Die Schreiberaufzeichnung erfolgte über einen Zeitraum von 5 - 10 min pro Meßküvette. In diesem Zeitraum zeigten alle Cytochrome einen Übergang vom oxidierten in den reduzierten Zustand.

Nur wenn die Kontrollversuche völlig driftfreie Messungen ergaben, wurden die Mitochondrien für weitere Versuche eingesetzt.

Es erfolgten weiterhin polarographische Messungen des Sauerstoffverbrauchs mittels einer Platinmehrdrahtelektrode bei 25°C in einem speziell hierfür gebauten Reaktionsgefäß (39,40). Hierfür wurden die Mitochondriensuspensionen im Verhältnis 1:40 mit MIII-Puffer verdünnt und davon wurden jeweils 0.1 ml Mitochondriensuspension mit 0.05 ml 1 $mol \cdot l^{-1}$ Succinat sowie 0.01 ml 0.2 $mol \cdot l^{-1}$ ADP versetzt. Die Abnahme des Sauerstoffdruckes wurde auf einem Schreiber registriert und daraus der O_2-Verbrauch berechnet.

B.2.2.6. Bestimmung der Cytochromkonzentration

Auch die Ermittlung der einzelnen Cytochromkonzentrationen der Mitochondriensuspensionen wurde am Double-Beam-Spektrometer durchgeführt.

Dazu wurden die jeweiligen Spektren der Cytochrome, wie unter B.2.2.5. beschrieben, aufgenommen.

Die Wellenlängenpaare wurden hierfür wie folgt eingestellt (7):

Cytochrom aa_3	(A) = 605 nm	(B) = 630 nm
Cytochrom b	(A) = 563 nm	(B) = 575 nm
Cytochrom c	(A) = 550 nm	(B) = 541 nm

A gibt jeweils das Absorptionsmaximum und B den dazugehörigen isosbestischen Punkt an (molare Extinktionskoeffizienten s. C.1.3.).

Die Spektren wurden über eine Zeitdauer von 5 -10 min (Reduktionszeit) ermittelt und die Extinktionsdifferenz zwischen oxidiertem und reduziertem Zustand ausgemessen und daraus unter Einbeziehung des Proteingehaltes (B.2.2.4.) die Konzentration berechnet.

B.2.3. Photometrische Bestimmungen am Rapidspektrometer

B.2.3.1. Messungen in klaren Lösungen

Zur Darstellung der einzelnen Cytochromkomponenten der Atmungskette wurden die Absorptionsbanden isolierter Cytochrome (B.2.1.5. und B.2.1.6.) im vollständig oxidierten und

reduzierten Zustand sowie deren Übergänge aufgenommen.
Aus diesen Spektren konnten die Absorptionsmaxima der einzelnen Cytochrome bestimmt werden.

Die Messungen am Rapidspektrometer (A.2.) erfolgten in Glasküvetten von 1 cm Schichtdicke bei einer mittleren Wellenlänge von 575 nm und einem Bereich zwischen 510 - 630 nm. Es wurden mittels Schwingspiegel pro sec 50 Einzelaufnahmen gemacht, die Daten zum Rechner H 516 (Fa. Honeywell) übertragen, auf Magnetbändern gespeichert und später nach verschiedenen Gesichtspunkten ausgewertet.

Gemessen wurde gegen eine Pufferlösung M III (0.25 $mol \cdot l^{-1}$ Sacharose, 10 $nmol \cdot l^{-1}$ Triäthanolaminpuffer, 2 $nmol \cdot l^{-1}$ Magnesiumchlorid, 4 $nmol \cdot l^{-1}$ Kaliumdihydrogenphosphat, pH 7.4), in der die oxidierten Cytochrome auch gelöst bzw. verdünnt wurden. Die Reduktion der Cytochrome erfolgte durch Zusatz von 100/ul 0.1 $mol \cdot l^{-1}$ Natriumdithionit pro Meßküvette.

In der gleichen Weise wurden auch die Absorptionsbanden von isoliertem Hämoglobin (B.2.1.7.) und Myoglobin (Dissertation V. Schwarzmann, 27) gemessen und ausgewertet.

B.2.3.2. Streuungsmessungen

Die in diesem Kapitel dargestellte Methode zur Analyse der Einflüsse der Streuung auf gemessene Absorptionsspektren verschiedener Komponenten, benutzt ein Modellsystem, das sich schrittweise den Verhältnissen im intakten Organ annähert.

Es wurden hierzu für jede Meßreihe Transmissions- und Reflexionsspektren am Rapidspektrometer T 13/3 in schneller Übernahme, d.h. mit Schwingspiegel über einem Wellenlängenbereich von 510 - 630 nm aufgenommen.
Die Messungen erfolgten in Glasküvetten von 1 cm bzw. 1 mm Schichtdicke.
Die Meßdaten wurden auf Magnetbändern gespeichert und nach der Zwei-Fluß-Theorie nach Kubelka und Munk (42, 43) ausgewertet.

Das Prinzip dieser Auswertung ist im Kapitel B.2.4. ausführlich beschrieben.

B.2.3.2.1. Eichreihen mit reinem Hämoglobin

Für die Eichreihen an Hämoglobin wurde das reine konzentrierte Hämoglobin (B.2.1.7.) zunächst im Verhältnis 1:20 (v/v) mit MIII-Puffer verdünnt und oxygenierte Spektren verschiedener Konzentrationen aufgenommen.

Die Messungen der Eichreihen erfolgten im durchfallenden und im reflektierten Licht.

Zur Auswertung wurden zunächst die Extinktionen am Absorptionsmaximum (577 nm) gegen die jeweiligen Hb-Konzentrationen aufgetragen.

Eine weitere Auswertung wurde im Rahmen der Streuungsversuche nach der Zwei-Fluß-Theorie (42, 43) ausgeführt und wird im Kapitel B.2.4. "Mathematische Auswertmethoden" ausführlich beschrieben.

B.2.3.2.2. Hämoglobineichreihen mit Polyacrylamidkapseln

Um die Hämoglobineichreihen zu erweitern, wurden die für Modellzwecke hergestellten Polyacrylamidkapseln (B.2.1.4.) in der Größe 0.2/um (kleiner als die Mitochondrien), dann die Größe 5 /um (etwas größer als die Mitochondrien) und zuletzt die Größe 30/um (größer als die größten Partikel der Homogenate) zugesetzt.

Die gefriergetrockneten Kapseln wurden in definierten Konzentrationen (5 - 100 mg/ml) in MIII-Puffer aufgenommen und suspendiert.
Pro Meßküvette wurden jeweils 100/ul dieser Kapselsuspensionen einpipettiert, mit Hämoglobin und Puffer versetzt, gerührt und für alle Hämoglobinkonzentrationen Messungen im durchfallenden und reflektierten Licht ausgeführt.

B.2.3.2.3. Hämoglobineichreihen mit Gehirnmitochondrien

In Fortführung der Eichreihen mit reinen Hämoglobinlösungen und Kapselsuspensionen wird der Einfluß der Streuung, der durch die Mitochondrien verursacht wird, untersucht.

Hierzu wurde die gleiche Meßanordnung wie unter B.2.3.2.1. benutzt.
Definierte Mengen (0.1 ml) der Mitochondriensuspension wurden in die Küvetten einpipettiert, mit steigenden Konzentrationen von Hämoglobin versetzt und mit dem Verdünnungspuffer (MIII) auf ein konstantes Endvolumen aufgefüllt.
Die Proben wurden während des Meßvorgangs gerührt und alle Einzelmessungen jeweils im durchfallenden und reflektierten Licht durchgeführt.

Die Auswertung erfolgte nach dem unter B.2.3.2.1. beschriebenen Prinzip.

B.2.3.2.4. Hämoglobineichreihen mit Gehirnhomogenaten

In Annäherung der Streuverhältnisse des Gewebes folgten Hämoglobineichreihen in Gehirnhomogenaten.

Hierzu wurden 500/ul Homogenatsuspension, wie aus B.2.1.1. erhalten, ebenso mit steigenden Hämoglobinkonzentrationen versetzt und mit MIII-Puffer auf ein konstantes Endvolumen gebracht.

Bei der Messung und Auswertung wurde wie bei den Streuversuchen der Mitochondrien verfahren.

B.2.3.3. Aufnahmen von biologischen Komponenten

B.2.3.3.1. Gehirnmitochondrienspektren

In Ergänzung der bereits durchgeführten Modelluntersuchungen mit Hämoglobin als Absorptionskomponente und verschiedenen Streuparameter wie Suspensionen von Polyacrylamidkapseln, Gehirnmitochondrien- und homogenaten, sollten nun Untersuchungen an hämoglobinfreien Gehirnmitochondrien durchgeführt werden, wobei hier die Absorption durch die Cytochrome der Atmungskette entsteht.

Meerschweinchengehirnmitochondrien wurden wie unter B.2.1.2. beschrieben hergestellt und deren Absorptionsspektren mit dem Photometer gemessen.
Dabei wurden oxidierte Spektren, reduzierte Spektren (Reduktion mittels 0.2 $mol \cdot l^{-1}$ ADP und 1.0 $mol \cdot l^{-1}$ Succinatzusatz) und Differenzspektren in zwei Darstellungsverfahren, der schnellen Übernahme mit Schwingspiegel (50 Spektren pro s) und der langsamen Übernahme (Durchlaufen des gesamten Wellenlängenbereiches von 510 - 630 nm in einer Zeitspanne von 1'17" durch Gitterdrehung) aufgenommen.

Die Einzelmessungen erfolgten in Glasküvetten mit 1 cm Schichtdicke gegen MIII-Verdünnungspufferlösung. Eine spezielle Rührvorrichtung verhindert eine Sedimentation der Mitochondrien.
Die Messungen mit Schwingspiegel wurden jeweils im durchfallenden und im reflektierten Licht durchgeführt (Kap. 2.4., Abb. 3).

Um den Einfluß der Schichtdicke der Meßküvette zu untersuchen, schlossen sich vergleichende Messungen in konzentrierten Mitochondriensuspensionen in 1 mm Küvetten an.

Ein Teil der Messungen wurde an Mitochondrien mit oxidierten Cytochromen (durch Begasen mit reinem Sauerstoff), ein weiterer Teil an Mitochondrien mit reduzierten Cytochromen (durch Zusatz von 100/ul 1 $mol \cdot l^{-1}$ Na-Dithionit-Lösung) ausgeführt.
Es fanden für beide Gruppen jeweils Messungen in Transmission und Reflexion statt.
Die Auswertung erfolgte nach dem Modell der Zwei-Fluß-Theorie (B.2.4.).

B.2.3.3.2. Gehirnhomogenatspektren

Meerschweinchengehirnhomogenate wurden wie unter B.2.1.1. beschrieben hergestellt und, analog zu den Untersuchungen an Gehirnmitochondrien, deren Absorptionsspektren gemessen. Es wurden oxidierte, reduzierte und Differenzspektren mit dem Rapidspektrometer aufgenommen. Die Messungen erfolgten in Küvetten mit 1 cm und 1 mm Schichtdicke und wurden jeweils im durchfallenden und im reflektierten Licht ausgeführt.

Die Auswertung entsprach dem Modell der Zwei-Fluß-Theorie.

B.2.3.3.3. Gehirnschnittspektren

Die nun folgenden Untersuchungen an Gehirnschnitten bildeten die letzte Stufe der Modellserie der schrittweisen Annäherung der Verhältnisse in dem intakten Gewebe.

Hierzu wurden Meerschweinchengehirne zunächst hämoglobinfrei perfundiert, wie unter B.2.1.3. beschrieben. Anschließend wurden von Herrn T. Fujii (44,45) Gehirnschnitte der Großhirnrinde in einer Dicke von 400 - 500/um angefertigt.
Diese Gehirnschnitte wurden in Krebs-Ringer-Lösung unter Zusatz von 95% O_2 inkubiert.
Die photometrischen Messungen der Gehirnschitte erfolgten auf einem Objektträger. Gemessen wurde die Transmission und Reflexion, wobei für Reflexionsmessungen dem Objektträger weißes Papier untergelegt wurde.
Zusätzlich reduzierte Cytochromspektren der Schnitte konnten durch Auftropfen von 100/ul 1 $mol \cdot l^{-1}$ Na-Dithionit-Lösung erhalten werden.
Die Auswertung erfolgte entsprechend allen anderen Untersuchungen dieses Kapitels nach der Zwei-Fluß-Theorie.

B.2.3.4. Organspektren

B.2.3.4.1. Messungen am perfundierten Meerschweinchengehirn

Nach den zuvor beschriebenen Modelluntersuchungen (B.2.3.1. - B.2.3.3.) zur Analyse von Absorption und Streuung, sollte nun die Anwendung auf das Gewebe erfolgen.
Um entsprechend den Versuchen an hämoglobinfreien Gehirnmitochondrien (B.2.3.3.1.), Gehirnhomogenaten (B.2.3.3.2.) und den perfundierten Gehirnschnitten (B.2.3.3.3.) ebenfalls die Cytochromspektren des intakten Gehirns darzustellen, wurden die folgenden Untersuchungen am perfundierten Meerschweinchengehirn durchgeführt.

Die Gehirnperfusionen erfolgten nach der unter Kapitel B.2.1.3. beschriebenen Methode. Nachdem das Gehirn hämoglobinfrei gespült worden war, wurde die Schädelöffnung des Tieres so an den Lichtleiter des Photometers gefahren, daß er die gesamte Fläche in einem Abstand von ca. 2 - 3 mm abdeckte.

Nun wurden zunächst, bei schneller Übernahme mit Schwingspiegel, Aufnahmen des Gehirns während der Perfusion gemacht, zum Rechner H 516 übertragen und auf Magnetbändern gespeichert.

Anschließend wurde die Perfusion abgeklemmt und die daraus resultierenden Spektren aufgenommen.

Um nun ein vollständig oxidiertes Spektrum der Cytochrome zu erhalten, wurde die Perfusionslösung mit 2 ml 1 $mol \cdot l^{-1}$ Amytallösung versetzt und die entsprechenden Spektren übernommen.

Das es zur Auswertung notwendig ist, auch vollständig reduzierte Spektren zu erhalten, wurden dem Perfusat zuletzt 2 ml 1 $mol \cdot l^{-1}$ Natriumdithionitlösung zugesetzt und auch hier wurden die Spektren aufgezeichnet.

Das genaue Auswertungsverfahren für die Organspektren wird im Kapitel B.2.4.2. beschrieben.
Es handelt sich dabei einmal entsprechend der Voruntersuchungen um die Trennung von Absorptions- und Streuspektren und andererseits um die Bestimmung der Redoxzustände der Cytochrome während der Perfusion bzw. bei Perfusionsstop.

B.2.4. Mathematische Auswertmethoden

B.2.4.1. Transmissions- und Reflexionsphotometrie

Bei quantitativen Messungen im durchfallenden Licht mißt man die sogenannte Durchlässigkeit (Transmission) einer planparallelen Schicht für ein paralleles Lichtbündel:

$$T(\lambda) = \frac{I}{I_o}$$

Dabei bedeuten I und I_o die Strahlenleistung nach bzw. vor Durchgang der Strahlung durch die absorbierende Schicht. Dringt ein paralleles Strahlenbündel in ein homogenes Medium ein, so wird es teilweise an jeder Phasengrenze reflektiert, innerhalb des Mediums teilweise absorbiert und ein weiterer Teil davon wird gestreut.
Bei verdünnten Lösungen kann der Effekt der Reflexion an den Phasengrenzen durch experimentelle Maßnahmen weitgehend eliminiert werden, indem man die Strahlung zeitlich nacheinander durch zwei gleiche Küvetten schickt, von denen eine die absorbierende Lösung, die andere das nichtabsorbierende Lösungsmittel enthält.

Nicht eliminiert werden kann dagegen der Strahlenverlust, der durch Streuung an den Molekülen entsteht.
Bei echten Lösungen liegt der hierdurch entstehende Fehler jedoch innerhalb der Fehlergrenze der Meßmethode.
Dagegen entstehen bei kolloiden Lösungen durch Streuungen außerordentlich große Fehler, da Strahlungsverluste durch Absorption und durch Streuung sich nicht ohne weiteres voneinander trennen lassen, und die Streuung die Absorption überdecken kann. Die Streuung hängt von der Gestalt, der Größe und der Konzentration der Teilchen und der Wellenlänge der Strahlung ab und läßt sich nur in einfachen Fällen theoretisch erfassen.
Bei dem Versuch, das Absorptionsspektrum von Suspensionen aufzunehmen, werden die Schwierigkeiten bedeutend größer. Ist die Bedingung: Teilchengröße kleiner als die Wellenlänge des Lichtes nicht mehr zu erfüllen, überlagert die Streuung die Absorption so stark, daß ohne die Berücksichtigung der Streuung in der Transmission sich keine brauchbaren Spektren mehr gewinnen lassen. Zur Trennung des Einflusses von Streu- und Absorptionsvorgängen für reflektierte und durchfallende Strahlung sind eine Reihe von Theorien entwickelt worden (46).

Ein Versuch, Transmissions- und Reflexionsspektren bei Absorption und Streuung vorherzusagen, ist die Zwei-Fluß-Theorie (42, 43).
In der Probe werden nur zwei Ausbreitungsrichtungen angenommen. Streuung bewirkt, daß Licht von der einen Ausbreitungsrichtung in die andere Ausbreitungsrichtung "gestreut" wird. Durch Absorption wird Licht "vernichtet".
Der Teil des Lichtes, der gestreut bzw. absorbiert wird, ist jeweils der Lichtintensität proportional.

Dieses Modell läßt sich durch die Differentialgleichungen

$$\frac{dI}{dx} = -(s + a)\, I + sJ \qquad (1)$$

$$\frac{dJ}{dx} = (s + a)\, J - sI \qquad (2)$$

beschreiben (Symbole s. S. 30).

Die Koeffizienten $a = a(\lambda)$ bedeuten Lichtverlust (Absorption) und $s = s(\lambda)$ den Lichtaustausch zwischen den Richtungen I und J (Streuuung).

Um die Absorptions- und Streuspektren aus den Mitochondrien und Homogenatsuspensionen, sowie den Polyacrylamidkapselsuspensionen zu ermitteln, wurde eine zweiparametrige Zwei-Fluß-Theorie nach Kubelka und Munk (42, 43) verwandt und von F. Hannebauer und J. Hoffmann an die speziellen Verhältnisse unserer Versuche angepaßt.

Die Randbedingungen hierfür lauten:
a) die Meßküvette ist nur von einer Seite beleuchtet
b) die Rückseite der Küvette ist im reflektierten Licht mit einer ideal reflektierenden Schicht abgedeckt.

Diese Bedingungen waren bei allen unter B.2.3.1. - B.2.3.3. beschriebenen Streuungsmessungen erfüllt und sind in Abb. 3 schematisch dargestellt.

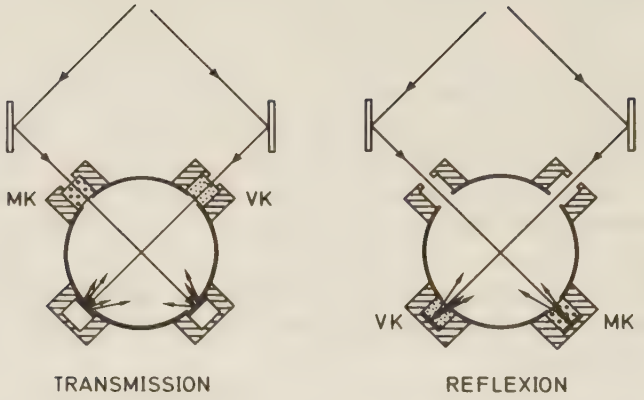


Abb. 3: Strahlungsverhältnisse und Reflexionsbedingungen in der Meßanordnung (MK = Meßküvette, VK = Vergleichsküvette)

Entscheidend für die Anwendung der Zwei-Fluß-Theorie ist, daß man sowohl ein Transmissions- als auch ein Reflexionsspektrum von dem zu messenden System hat.
Im folgenden wird der Lösungsweg, der zur Berechnung des Absorptions- und Streukoeffizienten führt, kurz dargestellt. Für die mathematische Auswertung wurden folgende Bezeichnungen verwandt:

$a(\lambda)$: Absorptionskoeffizient
$s(\lambda)$: Streukoeffizient
$T(\lambda)$: Transmissionsspektrum
$R(\lambda)$: Reflexionsspektrum
$t(\lambda)$: neg. Logarithmus des Transmissionsspektrums
$r(\lambda)$: neg. Logarithmus des Reflexionsspektrums
d : Schichtdicke der Küvette
I_o : Einstrahlendes Licht
I : Durchfallendes Licht
J : Reflektiertes Licht

Es gelten folgende Beziehungen für das Transmissionsspektrum und das Reflexionsspektrum:

$$T = \frac{4\beta \cdot \exp(-Kd)}{(1+\beta)^2 - (1-\beta)^2 \exp(-2Kd)} \qquad (3)$$

$$R = \frac{(1+\beta)\cdot\exp(-Kd)+(1-\beta)\cdot\exp(Kd)}{(1-\beta)\cdot\exp(-Kd)+(1+\beta)\cdot\exp(Kd)} \qquad (4)$$

$$K = (a(a+2s))^{1/2} \quad ; \quad \beta = (a/(a+2s))^{1/2} \qquad (5)$$

K und ß stellen hierbei Abkürzungen dar und enthalten jeweils den Absorptionskoeffizienten a (λ) und den Streukoeffizient s (λ).

Mit dem Photometer werden Extinktionen gemessen, d.h. die Meßdaten sind bereits logarithmiert.
Für die Auswertung gilt daher:

$$t(\lambda) = -\ln T(\lambda) \qquad (7)$$

$$r(\lambda) = -\ln R(\lambda) \qquad (8)$$

Die Zwei-Fluß-Theorie beschreibt, wie sich Transmission T (λ) und Reflexion R (λ) aus der Absorption a (λ) und der Streuung s (λ) berechnen lassen.
Um nun aus den gemessenen Daten für die Transmission und die Reflexion den Absorptionskoeffizienten a (λ) und den Streukoeffizienten s (λ) zu ermitteln, muß eine Umkehrung vorgenommen werden, d.h. aus

$$T = T(a, s) \qquad (9)$$

$$R = R\,(a, s) \tag{10}$$

muß nun die Beziehung

$$a = a\,(T, R) \tag{11}$$

$$s = s\,(T, R) \tag{12}$$

hergestellt werden.
Bei Beachtung von physikalischen Nebenbedingungen ($a, s > 0$) ist, wie J. Hoffmann zeigen konnte, diese Umkehrung möglich.

Aus physikalischen Gründen muß das in die Küvette einstrahlende Licht I_o stets größer sein als das durchfallende Licht I oder das reflektierte Licht J.

$$I_o > I$$

$$I_o > J.$$

Es ergeben sich hieraus Wertebereiche für Transmission und Reflexion:

$$o \leq T \leq 1$$

$$o \leq R \leq 1.$$

Will man die bisher abgeleiteten Formeln zur Auswertung heranziehen, so müssen absolute Transmissions- und Reflexionsspektren gemessen werden. Im Experiment sind jedoch relative Messungen einfacher herzustellen, deshalb soll nun eine Auswertung vorgestellt werden, die auch auf relative Messungen anwendbar ist.
Hierfür soll zunächst der Fall Streuung = O betrachtet werden.

Hier gilt das Lambert-Beersche Gesetz; vorausgesetzt daß beim Reflexionsspektrum die Rückseite der Küvette mit einem idealen Spiegel abgedeckt ist.

$$T(\lambda) = e^{-ad} \qquad (13)$$

$$R(\lambda) = e^{-2ad} = T^2 \qquad (14)$$

oder

$$t(\lambda) = ad \qquad (15)$$

$$r(\lambda) = 2ad = 2t(\lambda) \qquad (16)$$

Diese Formeln können benutzt werden, um die Anwendbarkeit des Lambert-Beerschen Gesetzes zu testen.
Um diese Annahme zu prüfen, werden die Reflexionsspektren gegen die Transmissionsspektren aufgetragen.
Wenn das Lambert-Beersche-Gesetz gültig wäre, müßte eine lineare Abhängigkeit der Extinktionen bestehen, die unabhängig von der Wellenlänge ist (Abb. 4).
In partikelhaltigen Lösungen oder im Gewebe findet man jedoch keine lineare Abhängigkeit zwischen $t(\lambda)$ und $r(\lambda)$, sondern eine Verzerrung der Spektren, die durch die Streuung verursacht ist.
Im folgenden soll die Wellenlängenabhängigkeit der Streuung geprüft werden.

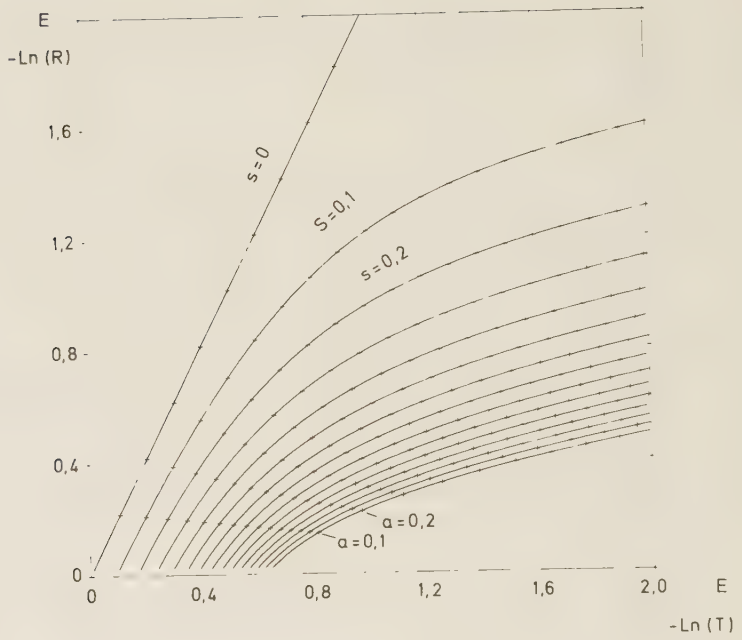


Abb. 4: Darstellung einer Transformation zwischen einem Reflexionsspektrum und einem Transformationsspektrum.

Eine Aussage über den Streukoeffizienten erhält man aus Abb. 4. In der Darstellung muß aus physikalischen Gründen die Transformation immer unterhalb der Geraden r (λ) = 2t (λ)

liegen. Auf der Geraden selbst ist die Streuung gleich Null. Stellt die Transformation gekrümmte Linien dar, so weist dies auf eine konstante Streuung hin, wobei hohe Streuungen durch eine stark gekrümmte und vom Nullpunkt nach rechts verschobene Kurve gekennzeichnet sind.
Bei einer wellenlängenabhängigen - also veränderlichen - Streuung findet man eine Auftrennung der Transformation, d.h. man findet verschiedene Streukoeffizienten innerhalb einer Darstellung.
Das Spektrum des Streukoeffizienten stellt bei den Transmissions- und Reflexionsspektren einen großen Störfaktor dar, da es das eigentliche interessierende Absorptionsspektrum überlagert oder gar überdeckt.
Zur weiteren Auswertung wird nun für jeden Einzelversuch das Spektrenpaar der Transmissions- und Reflexionsmessung herangezogen.
Für jede Wellenlänge des gemessenen Bereiches von 510 - 630 nm existiert sowohl ein Transmissions- als auch ein Reflexionswert. Nun läßt sich aufgrund der Zwei-Fluß-Theorie ebenfalls der wahre Absorptionswert und der Streuwert für alle Wellenlängen berechnen.
Trägt man nacheinander diese errechneten Werte gegen die zugehörigen Wellenlängen auf, so erhält man für jeden Meßansatz das wahre Absorptionsspektrum und das entsprechende Streuspektrum.

B.2.4.2. Auswertung von Organspektren

Nach Abschluß der beschriebenen Untersuchungen, sollte nun die Anwendung der Methode auf Gewebespektren erfolgen. Nachdem die Zwei-Fluß-Theorie den Effekt der Streuung für Küvetten endlicher Schichtdicke gut beschreibt, darf angenommen werden, daß sich diese Theorie auch auf Meßproben unendlicher Schichtdicke anwenden läßt.

Im Gegensatz zu allen zuvor gemessenen Proben, ist es bei den meisten intakten Organen nicht möglich, Transmissionsspektren aufzunehmen, da diese nicht vom sichtbaren Licht durchstrahlt werden können. Man erhält somit nur Informationen aus den Reflexionsspektren.
Entsprechend der Transformation zwischen Reflexionsspektrum und Transmissionsspektrum (Abb. 4), läßt sich ebenfalls eine schematische Darstellung berechnen, aus der ein Streukoeffizient abgelesen werden kann, wenn hierfür die Extinktionen des Reflexionsspektrums gegen die Extinktionswerte der wahren Absorption aufgetragen werden. Diese Darstellung setzt aber voraus, daß das wahre Absorptionsspektrum bekannt ist. Unter Berücksichtigung der unendlichen Schichtdicke ergeben sich die in Abbildung 5 dargestellten Kurven für den Streukoeffizienten. Entlang jeder Linie bleibt der Streukoeffizient konstant.

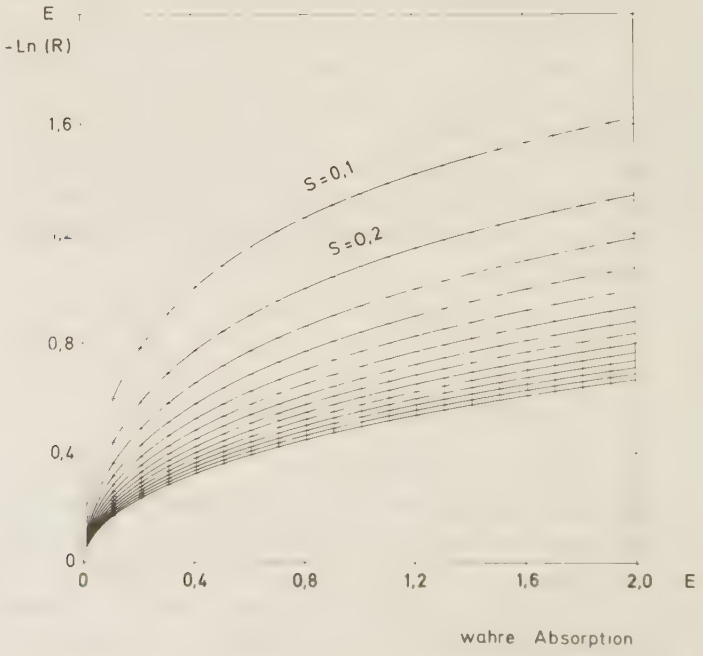


Abb. 5: Transformation zwischen einem Reflexionsspektrum und wahren Absorptionswerten für den Fall unendlicher Schichtdicke.

Im folgenden soll nun die Anwendung der Zwei-Fluß-Theorie auf die Organspektren diskutiert werden.
Bei der Messung von Organspektren handelt es sich um Reflexionsspektren unendlicher Schichtdicke.
Setzt man diese Bedingung in Formel 4, Kapitel B.2.4.1. ein, so ergibt sich folgende Beziehung für Reflexionsspektren:

$$R = \frac{1 - \beta}{1 + \beta} \qquad (\text{für } d = \infty) \qquad (17)$$

$$\beta = (a/(a + 2s))^{1/2} \qquad (18)$$

nach dem Quotienten von Absorption und Streuung aufgelöst, folgt:

$$\frac{a}{s} = \frac{(1 - R)^2}{2R} \; . \qquad (19)$$

Im Gegensatz zu den Modellversuchen und Untersuchungen an Gehirnschnitten, wo Transmissions- und Reflexionsspektren aufgenommen werden konnten und daraus die Absorptions- und Streukoeffizienten ermittelt wurden, kann in diesem Fall nur der Quotient aus a und s gemessen werden.
Zur Auflösung dieses Quotienten und damit zur Bestimmung beider Komponenten müssen weitere Informationen herangezogen werden.
Dies geschieht, indem man als erste Annahme einen Streukoeffizienten zugrunde legt, wie er bei Gehirnschnitten ermittelt wurde.
Durch Vorgabe dieses Streukoeffizienten kann der Absorptionskoeffizient bestimmt werden. Das so berechnete Absorptionsspektrum wird als "wahres" Absorptionsspektrum bezeichnet.
Die Prüfung dieses wahren Absorptionsspektrums über den gesamten Wellenlängenbereich von 510 - 630 nm erfolgt durch den Vergleich mit Grundspektren, d.h. mit der Zusammensetzung reiner Cytochromspektren von gleichwertigen Oxidationsgraden.

Da bei den Aufnahmen von Grundspektren (Messungen in klaren Lösungen B.2.3.1.) keine Streukomponente vorhanden ist, zeigt der direkte Vergleich zwischen dem wahren Absorptionsspektrum und den rückgerechneten Grundspektren, ob das Streuspektrum ausreichend eliminiert wurde.
Ist dies noch nicht der Fall, so wird die Form des Streuspektrums solange verändert, bis ein guter Fit gewährleistet ist.
Durch die Vorversuche, d.h. die Cytochromeinzelmessungen in klaren Lösungen bei verschiedenen Oxygenierungsgraden und die Versuchsreihe mit der allmählichen Annäherung an die inhomogenen Verhältnisse des Gewebes wurden entscheidende Informationen gewonnen, die es schließlich ermöglichten, die Zwei-Fluß-Theorie auch auf das Gewebe anzuwenden, obwohl hier nur Reflexionsspektren gewonnen werden können.

Der zuvor beschriebene Auswertungsweg erlaubt entsprechend der Küvettenversuche ebenfalls eine Auftrennung von wahrem Absorptionsspektrum und Streuspektrum.

Aufgrund der Resultate ist bekannt, daß die Reflexionsspektren des Gehirns ein Signal von geringerem Extinktionshub bei größerer Grundextinktion liefern. Dieser geringe Extinktionshub erlaubt es, das System weitgehend zu linearisieren. Für die Abbildung 5 heißt das, daß man sich im Bereich eines hohen Streukoeffizienten und eines hohen Absorptionskoeffizienten befindet.

Durch diese Tatsache, die in den Reflexionsbedingungen der weißen Gehirnoberfläche begründet ist, ist es möglich, für Messungen des Redoxverhältnisses der Cytochrome am Gehirn von dem komplizierteren Auswertungsmodell der Zwei-Fluß-Theorie abzusehen und eine vereinfachte Auswertungsmethode anzuwenden.
Für Messungen an anderen Organoberflächen, die ungünstigere Reflexionsbedingungen aufweisen, muß auf die Zwei-Fluß-Theorie zurückgegriffen werden.

Die Auswertung der gemessenen Gehirnspektren erfolgte deshalb nach dem Prinzip der linearen Mehrkomponentenanalyse (52).

Experimentell sind für die Anwendung der linearen Mehrkomponentenanalyse Reflexionsspektren aufzunehmen, die den vollständig oxidierten und reduzierten Zustand der Atmungsenzyme der Gehirnmitochondrien im intakten Organ zeigen. Dies ist durch Zugabe entsprechender Pharmaka zu der Perfusionslösung leicht durchzuführen. Diese Spektren dienen in der Auswertung als Bezugspektren. Ein Zwischenzustand wird aus diesen beiden Bezugsspektren gebildet.
Bei der Auswertung wird das gemessene Cytochromspektrum während der normalen Gehirnperfusion aus den Bezugsspektren errechnet.
Dabei wird die Annahme geprüft, daß die Cytochrome in ihrem Sättigungsverlauf jeweils die gleiche Kinetik verfolgen. Zu diesem Zweck wird aus den Bezugsspektren ein mittlerer Oxygenierungsgrad für alle Cytochrome aufgezeichnet mit einer entsprechenden Fehlerfunktion, die die Abweichungen zum tatsächlich gemessenen Spektrum darstellt.

Im einfachsten Fall wird angenommen, daß sich der Oxidationszustand der Atmungsenzyme gleichmäßig ändert. Die sich ergebenden Zwischenzustände werden durch einen Oxidationsgrad bestimmt, der deswegen als mittlerer Oxidationsgrad bezeichnet wird. Haben die einzelnen Cytochrome unterschiedliche Kinetiken, so entstehen Zwischenzustände, die sich nicht durch eine Linearkombination der Bezugsspektren des Gehirns in vivo beschreiben lassen. Je größer die Unterschiede in der Kinetik sind, um so größer wird der Fehler der diese Abweichung charakterisiert. Eine Verringerung des Fehlers läßt sich dadurch erreichen, daß man das Gesamtspektrum in Wellenlängenbereiche unterteilt, in denen das Spektrum im wesentlichen einer Cytochromkomponente zugeordnet werden kann. Diese Auswertung wird im folgenden als Bereichsauswertung bezeichnet. Durch geschickte Auswahl der Bereiche läßt sich der Fehler gegenüber der Auswertung nach dem mittleren Oxidationsgrad deutlich verringern.

C. ERGEBNISSE

C.1. Ergebnisse der Darstellungen

C.1.1. Histologische und elektronenmikroskopische Untersuchungen

Die histologische Auswertung von Gehirnhomogenaten und Gehirnmitochondrien ergaben folgende Befunde:

1. Homogenat: Durch die Ausstrichtechnik fand eine gewisse Entmischung statt. Sie bewirkte, daß zunächst die Mitochondrien, dann fädige Strukturen und schließlich Zellen und Zellfragmente haften bleiben.
   Die größten Partikel wiesen einen Durchmesser bis zu 30/um auf.
   Die zahlreichen fädigen Strukturen, vermutlich Neurite, waren häufig sternförmig aneinander geheftet (Abb. 6).

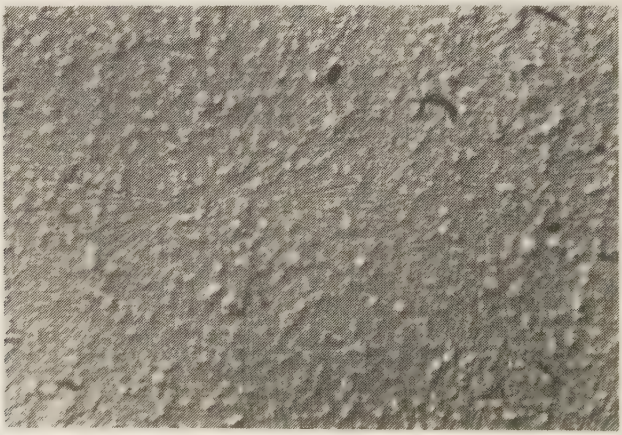


Abb. 6: Homogenatausstrich vom Meerschweinchengehirn (Vergrößerung 1:450) ⟵ 100/um

Aus den gleichen Homogenatpräparationen wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen hergestellt. Sie zeigen neben zahlreichen Mitochondrien einige Cytoplasmateile, Myelinscheiden, Peroxisomen sowie multivesikuläre Körper (Träger von saurer Phospatase).

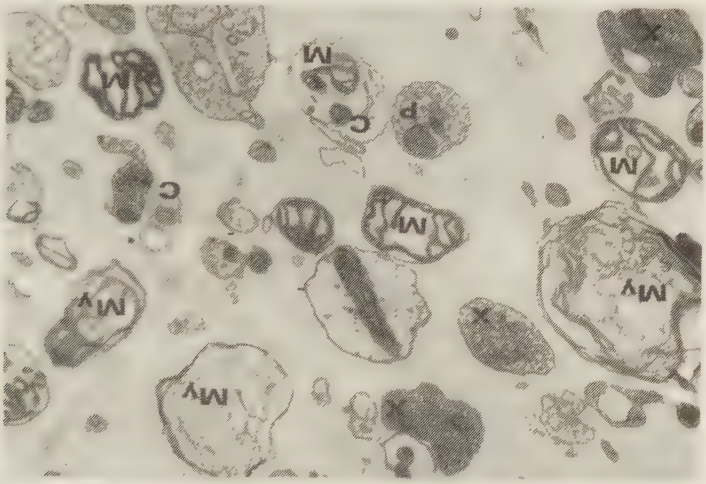


Abb. 7: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Gehirnhomogenatpräparation (1:20 000)
1/um

X = multi-vesikuläre Körper; C = Cytoplasma;
M = Mitochondrien; My = Myelin; P = Peroxisomen

2. Mitochondrien: Die Mitochondrienfraktion nach der Durchführung aller Reinigungsschritte ergab ein sehr einheitliches Bild. Zellige Elemente waren so gut wie nicht mehr vorhanden. Die Größe der Mitochondrien betrug 1 - 2/um (Abb. 8).

Eine vereinfachte Darstellungsmethode für Gehirnmitochondrien zeigte einen wesentlich geringeren Reinheitsgrad der Mitochondrienfraktion. Hier waren Zellen und Zelltrümmer gleichmäßig zwischen den Mitochondrien verteilt (Abb. 9)

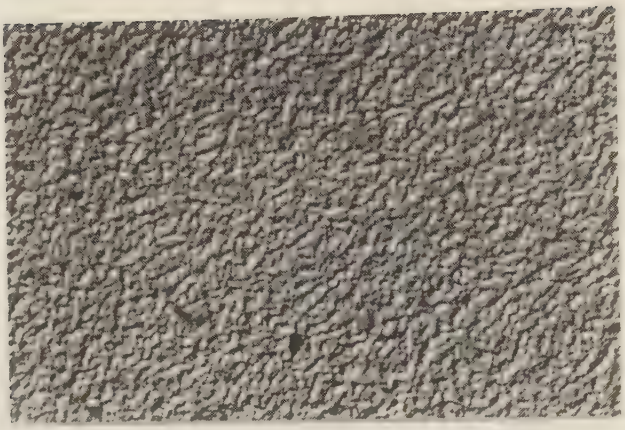


Abb. 8: Gehirnmitochondrien, nach Anwendung aller Reinigungschritte (Vergrößerung 1:450)

100/um

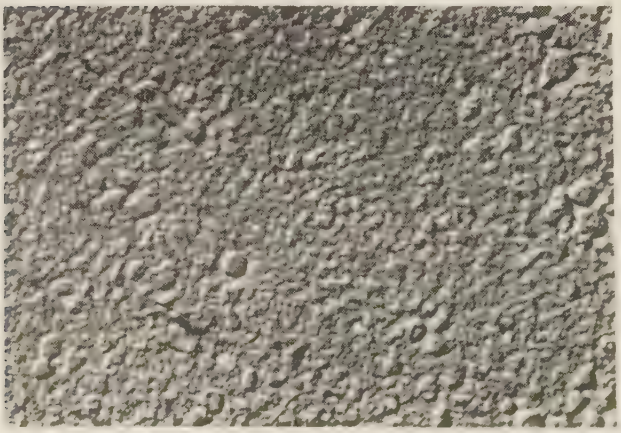


Abb. 9: Gehirnmitochondrien, vereinfachte Präparationstechnik (Vergrößerung 1:450)

100/um

Auch in der elektronenmikroskopischen Untersuchung der mehrfach gereinigten Mitochondrienpräparation zeigen sich vereinzelt Lysosomen, Peroxisomen und einige mulivesikuläre Körper. Das Blickfeld ist jedoch überwiegend von Mitochondrien bestimmt. Größere Zellbestandteile und -fragmente sowie Myelinscheiden konnten aufgrund der wiederholten Zentrifugation und Aufschwemmung entfernt werden. Diese Untersuchungen dienten zur Bestimmung der Größe und der Größenverteilung einer Homogenat- oder Mitochondrienpräparation sowie deren Zusammensetzung bzw. Verunreinigung.

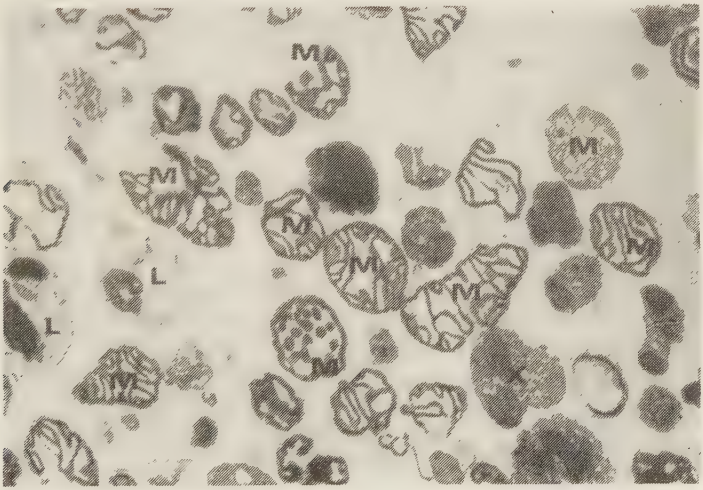


Abb. 10: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer mehrfach gereinigten Gehirnmitochondrienpräparation (1:20 000) ⟵⟶ 1/um
L = Lysosomen; P = Peroxisomen; X = multivesikuläre Körper; M = Mitochondrien

C.1.2. Güte der Mitochondrien - nach Bestimmung am Double-Beam-Spektrometer

Die Güte der Mitochondrien wurde aufgrund ihres Verhaltens bei der Reduktion bestimmt. Dabei wurde wie unter B.2.2.5. beschrieben vorgegangen.
Die Schreiberaufzeichnung wurde so eingestellt, daß ein Kanal das Differenzsignal zwischen Absorptionsmaximum und isosbestischem Punkt, ein weiterer Kanal nur das Spektrum des Absorptionsmaximums aufzeichnete.
Gemessen wurde die Transmission, wobei die gesamte Schreiberbreite (20 cm) einer Transmission von 100% entsprach. Aus der prozentualen Transmissionsänderung wurde die Extinktionsänderung nach der Formel

$$\Delta E = 0.435 \quad \frac{\Delta T}{T}$$ berechnet.

(Diese Formel ist eine Näherung und gilt nur für kleine Transmissionsänderungen).

Die auf diese Weise ermittelte Extinktionsänderung, diente im weiteren zur Konzentrationsbestimmung (C.1.3.) der jeweiligen Cytochrome.
Die Abbildung 11 zeigt eine Messung von mitochondrialem Cytochrom c. Die Wellenlänge für das Absorptionsmaximum wurde bei 550 nm, die des isosbestischen Punktes bei 541 nm (B.2.2.5.) eingestellt.
Zu Beginn der Messungen wurde der Kanal, der das Differenzspektrum zeigt, auf 50% Transmission, der zweite Kanal, der nur das Absorptionsmaximum aufzeichnet, auf 100% Transmission einjustiert. Abb. 11 zeigt einen Ausschnitt aus einer kontinuierlichen Registrierung unter den vorgegebenen Bedingungen. Die Reduktion selbst erfolgt sehr schnell und wird an der Verschiebung der Differenz sichtbar. Die Größe der Verschiebung

wird ausgemessen und dient als Grundlage der Extinktionsänderung. Nach vollständiger Reduktion stellt sich das Differenzsignal auf den neuen Wert ein und läuft unverändert weiter.
Die Reduktion zeigt sich natürlich auch in der Aufzeichnung des Absorptionsmaximums (Kanal 2).
Die Schreiberaufzeichnungsgeschwindigkeit betrug 30 mm/sec.

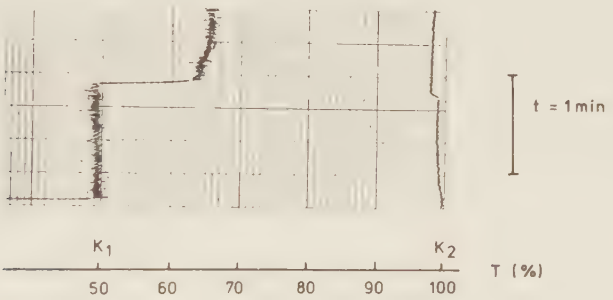


Abb. 11: Double-Beam-Spektrometeraufzeichnung für mitochondriales Cytochrom c mit Übergang vom oxidierten zum reduzierten Zustand (links: Differenzsignal zwischen Absorptionsmaximum und isosbestischem Punkt, rechts: Einzeldarstellung des Verhaltens am Absorptionsmaximum).
(K_1 = Kanal 1, K_2 = Kanal 2, T = Transmission)

Bei intakten Mitochondrien ist die Darstellung des Differenzsignals nahezu driftfrei im oxidierten und reduzierten Zustand.
Als weiterer Indikator für das biochemische Verhalten wurde der Sauerstoffverbrauch der Mitochondrien gemessen (B.2.2.5.).

Bei Verdünnung der Mitochondrien von 1:39.07 (v/v) lag die Änderung des Sauerstoffdruckes pro Minute im Mittel bei

$$\Delta P_{O_2/min} = 19.7 \pm 1.1 \text{ Torr}$$

Der Sauerstoffverbrauch wurde daraus mit 0.911 $\pm$ 0.046/ul O_2 / min x mg Protein ermittelt.
(α_{25^o} = 0.02718, n = 25, T = 25°C).

Bei einem solchen Sauerstoffverbrauch zeigten frische und nach dem angegebenen Verfahren präparierte Mitochondrien ein optisches Signal, das über längere Zeit konstant war und erfüllten damit die Voraussetzungen für unsere Untersuchungen (ausreichende Güte). Gealterte Mitochondrien zeigen bereits im oxidierten Zustand eine relativ starke Drift, die eine weitere Auswertung unmöglich macht. Von daher ist dies ein empfindlicher Nachweis für die Güte der Mitochondrienpräparation.

C.1.3. Cytochromkonzentrationen

Zur Bestimmung der Cytochromkonzentrationen wurde wie bereits unter C.1.2. beschrieben vorgegangen.
Für jedes mitochondriale Cytochrom wurden Reduktionsverläufe gezeichnet, daraus die Transmissionsänderung ausgemessen und in Extinktionsänderungen umgerechnet.
Um nun die Cytochromkonzentrationen, bezogen auf den Proteingehalt der Mitochondrien, zu erhalten, wurden diese Extinktionsänderungen nach der Formel

$$\text{Konzentration (nmol/mg Prot.)} = \frac{\Delta E \text{ x Verdünnung der Mitoch.}}{\text{Extinktionskoeff. x Proteingeh.}}$$

eingesetzt und daraus die Konzentration für jedes Cytochrom berechnet.

Als Extinktionskoeffizienten dienten

für Cytochrom aa_3 $\varepsilon = 0.016\ nM^{-1}\ cm^{-1}$
Cytochrom b $\varepsilon = 0.0285\ nM^{-1}\ cm^{-1}$
Cytochrom c $\varepsilon = 0.018\ nM^{-1}\ cm^{-1}$ (7).

Die Tabelle 1 zeigt die gemessenen Cytochromkonzentrationen der Gehirnmitochondriensuspensionen, die an verschiedenen Mitochondrienpräparationen durchgeführt worden sind. Die Absorptionsmaxima sowie die isosbestischen Punkte wurden wie unter Kapitel B.2.2.6. beschrieben eingestellt.

Cytochrom aa_3 nmol/mg Protein	0.215 ± 0.05	n = 28
Cytochrom b nmol/mg Protein	0.086 ± 0.02	n = 18
Cytochrom c nmol/mg Protein	0.289 ± 0.05	n = 31

Tabelle 1: Cytochromkonzentrationen von Gehirnmitochondriensuspensionen gemessen am Double-Beam-Spektrometer.

C.2. Photometrische Bestimmungen am Rapidspektrometer

Diese Untersuchungen wurden mit dem von Lübbers und Niesel (16-21) entwickelten Rapidspektrometer durchgeführt.

Es handelt sich hierbei um ein Zweistrahlphotometer, das sich durch hohe Registriergeschwindigkeit auszeichnet (Abb. 12-13). Als Lichtquelle dient eine Xenonhochdrucklampe. Der von ihr erzeugte Lichtstrahl wird zunächst an einem Spiegel reflektiert und auf den Eintrittsspalt eines Gittermonochromators fokussiert.
Im Parallelstrahlengang des Monochromators befindet sich ein Planspiegel, durch dessen Drehung um die vertikale Achse das Spektrum am Austrittsspalt des Monochromators vorbeigeführt wird. Da dieser Spiegel auf elekromagnetischem Wege zu Schwingungen von 50 Hz angeregt wird, wird das Spektrum hundertmal in der Sekunde durchfahren.

Bei ruhiggestelltem Schwingspiegel kann durch Gitterdrehung ebenfals ein Spektrum durchfahren werden. Ein zweiter Schwingspiegel (25 kHz) leitet das monochromatische Licht in einer optischen Brücke abwechselnd zur Meßprobe (Meßwert) und zur Vergleichsprobe (Vergleichswert). Beide Lichtstrahlen werden in einer Ulbricht'schen Kugel diffus gestreut und fallen schließlich auf den Photomultiplier, wo eine Umwandlung von Lichtenergie in elektrische Energie erfolgt.

Die Spannungsimpulse des Meßkanals und Vergleichskanals passieren abwechselnd mit der Frequenz des zweiten Schwingspiegels die Logarithmierstufe. Beide Impulse werden elektronisch getrennt und voneinander subtrahiert. Durch diese Differenzbildung der Logarithmen entsteht eine Meßspannung, die proportional der Differenz der Logarithmen der Photomultiplierimpulse ist. Daher ist diese Spannung proportional der Extinktion des Lichtes in der Probe.

Zur weiteren Auswertung erfolgt eine analog-digitale Wandlung der Meßwerte, und die Übernahme in den Speicher einer digitalen Rechenmaschine (Honeywell 516).

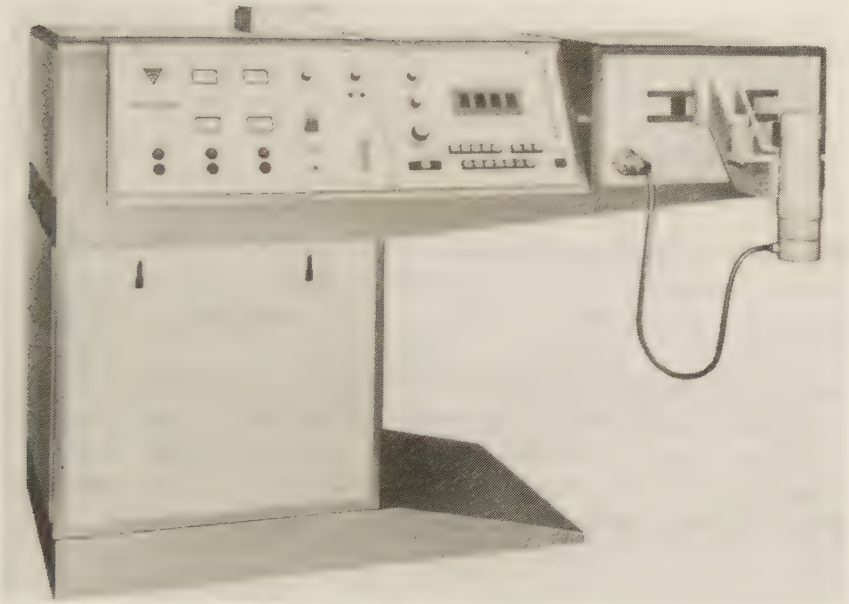
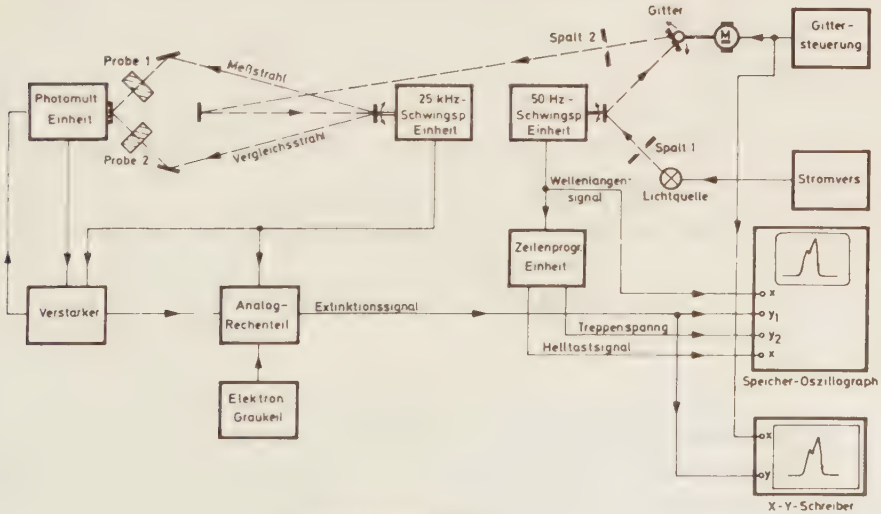


Abb. 12: Das Rapidspektrometer nach Lübbers und Niesel



Blockschaltbild

Abb. 13: Blockschaltbild des Rapidspektrometers nach Lübbers und Niesel

C.2.1. Messungen in klaren Lösungen

C.2.1.1. Reine Cytochromspektren

Die folgenden Abbildungen (Abb. 14-19) zeigen die Absorptionsbanden einzelner isolierter Cytochromkomponenten der Atmungskette im vollständig oxidierten und reduzierten Zustand.

Aus diesen Darstellungen wurden die Absorptionsmaxima der jeweiligen Cytochrome bestimmt (Tabelle 2). Im weiteren bildeten diese Absorptionsbanden eine Grundlage für die mathematische Auswertung von Grundspektren aus biologischen Meßreihen (Mitochondrien, Homogenaten, Organspektren).

	Cyt aa_3	Cyt b	Cyt c
Absorptions-maximum Red. (nm)	605.4 $\pm$ 1.2 n = 12	563.3 $\pm$ 0.9 n = 12	551.6 $\pm$ 0.7 n = 13

Tabelle 2: Reduzierte Absorptionsmaxima für Cytochrome in reiner Lösung.
(Spaltbreite des Photometers = 0,2 mm)

Alle in diesem Kapitel erfolgten Messungen wurden in Glasküvetten von 1 cm Schichtdicke durchgeführt.
Die relative Lage bezüglich der Extinktionsskala ist willkürlich gewählt, d.h. es gilt nur der Extinktionshub.

Die isosbestischen Punkte sind jedoch unmittelbar aus den Darstellungen abzulesen.

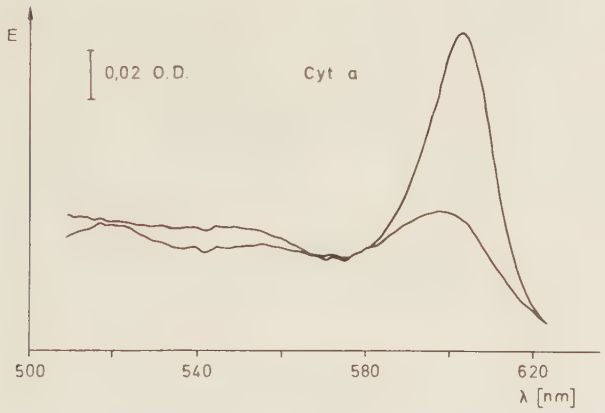


Abb. 14: Oxidiertes und reduziertes Spektrum von isoliertem Cytochrom aa_3
(Konz.: 93.7 $nmol \cdot l^{-1}$)

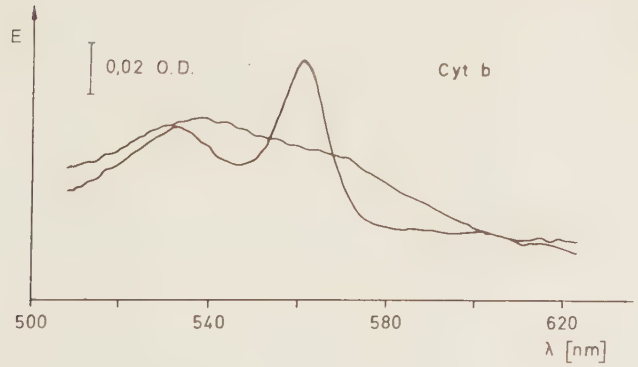


Abb. 15: Oxidiertes und reduziertes Spektrum von isoliertem Cytochrom b
(Konz.: 65.2 $nmol \cdot l^{-1}$)

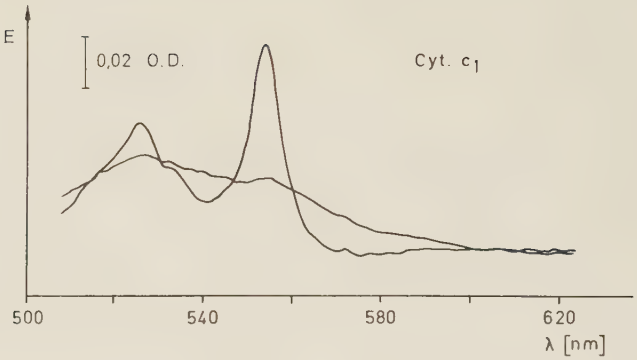


Abb. 16: Oxidiertes und reduziertes Spektrum von isoliertem Cytochrom c_1
(Konz.: 81 /umol·l^{-1})

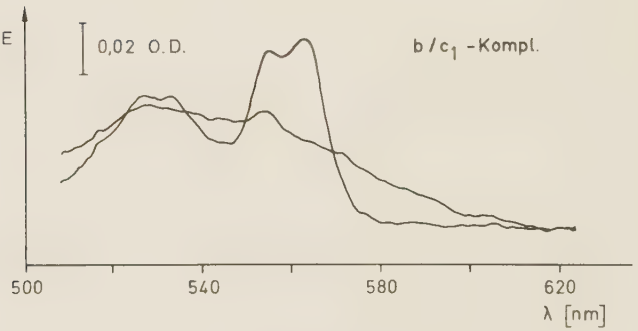


Abb. 17: Oxidiertes und reduziertes Spektrum von isoliertem Cytochrom b/c_1-Komplex
(Konz.: 29 /umol·l^{-1})

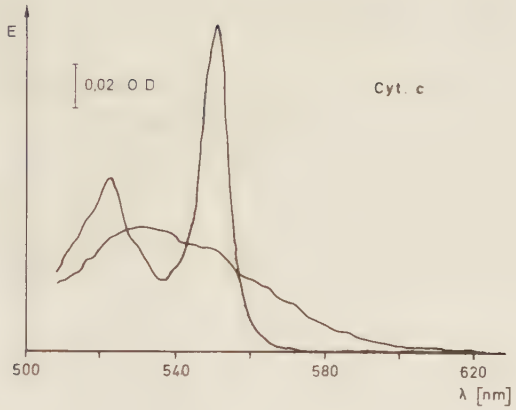


Abb. 18: Oxidiertes und reduziertes Spektrum von isoliertem Cytochrom c
(Konz.: 116.8 nmol·l^{-1})

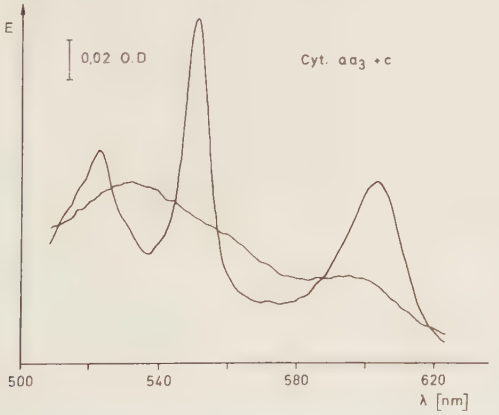


Abb. 19: Oxidiertes und reduziertes Spektrum einer Kombination von den isolierten Cytochromen aa_3 und c
(Konz.: Cyt aa_3 = 63.6 nmol·l^{-1}, Cyt c = 110.8 nmol·l^{-1})

Im folgenden werden kinetische Messungen an isolierten Cytochromen dargestellt. Die Methode hierzu ist unter B.2.3.1. beschrieben.
Die Abbildungen 20-25 stellen die Reaktionsabläufe der gezeigten Cytochrome dar. Die Reduktion erfolgte durch Zugabe von 100/ul Natrium-Dithionit-Lösung (1 $mol \cdot l^{-1}$).
Während der gesamten Reaktion wurden kontinuierlich 50 Spektren pro Sekunde aufgenommen.
Für die Dokumentation wurden je 32 Einzelspektren gemittelt.

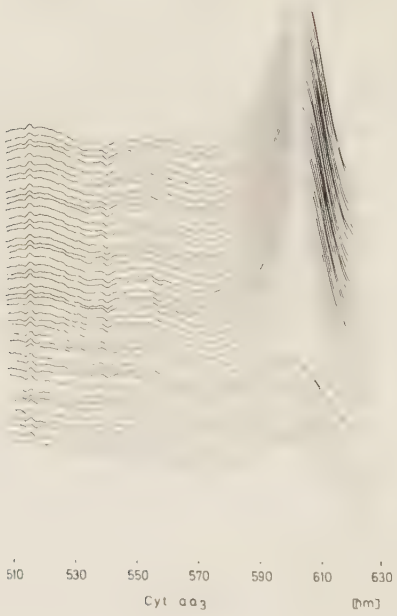


Abb. 20: Reduktionsverlauf für Cytochrom aa_3

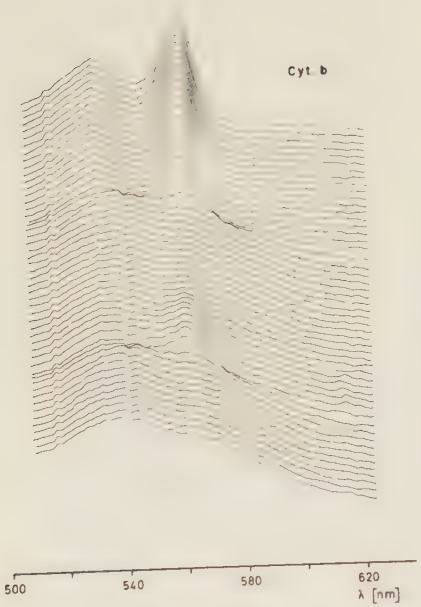


Abb. 21: Reduktionsverlauf für Cytochrom b

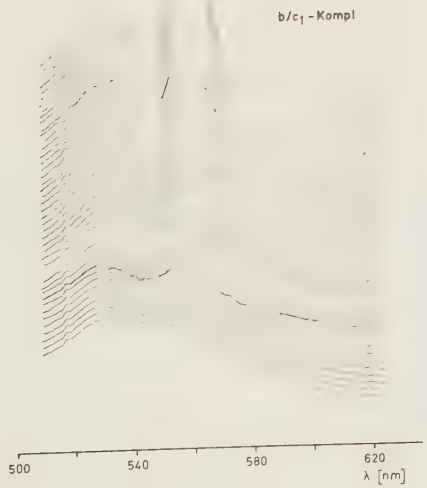


Abb. 22: Reduktionsverlauf für Cytochrom b/c_1-Komplex

Abb. 23: Reduktionsverlauf für Cytochrom c_1

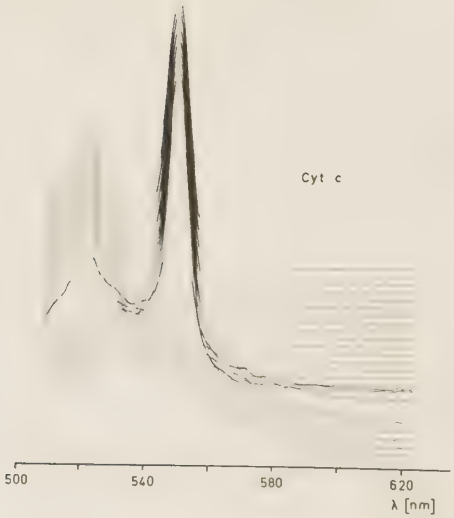


Abb. 24: Reduktionsverlauf für Cytochrom c

Abb. 25: Reduktionsverlauf für die Kombination von Cytochrom aa_3 und Cytochrom c

C.2.1.2. Hämoglobin und Myoglobin

In der gleichen Weise wie bei den Messungen an reinen Cytochromen wurden auch von Hämoglobin und Myoglobin vollständig oxygenierte und desoxygenierte Spektren sowie deren Übergänge aufgenommen, die später ebenfalls bei der Interpretation von Grundspektren von Bedeutung waren.

Die Abbildungen 26 und 27 zeigen Einzeldarstellungen von oxygenierten und desoxygenierten Spektren für Hämoglobin und Myoglobin.

In den Abbildungen 28 und 29 sind die Reaktionsabläufe für beide Komponenten dargestellt. Dabei wurden ebenso 50 Spektren pro Sekunde aufgenommen, davon je 32 Spektren gemittelt.

Die Desoxygenierung erfolgte entsprechend der Reduktion von Cytochromen mittels 100/ul 1 mol·l^{-1} Natriumdithionit.

Die Konzentrationen betrugen für Hämoglobin 5 g/100 ml Lösung und für Myoglobin 6,5 g/100 ml Lösung.

Die Absorptionsmaxima liegen für oxygeniertes Hämoglobin bei 577 und 541 nm und für Myoglobin bei 579 und 542 nm.

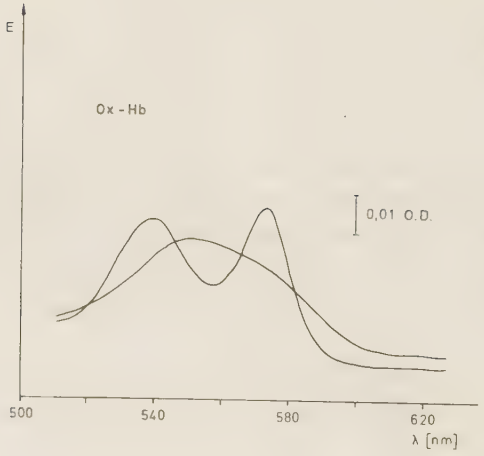


Abb. 26: Oxygeniertes und desoxygeniertes Spektrum von Hämoglobin (Konz. : 5 g Hb/ 100 ml Lösung)

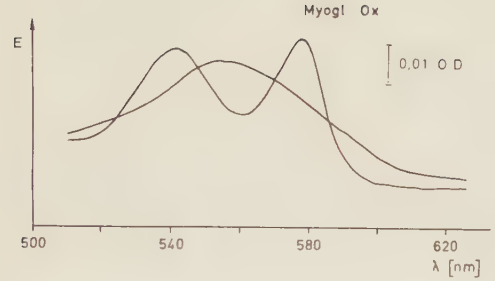


Abb. 27: Oxygeniertes und desoxygeniertes Spektrum von Myoglobin (Konz. : 6,5 g Mb/ 100 ml Lösung)

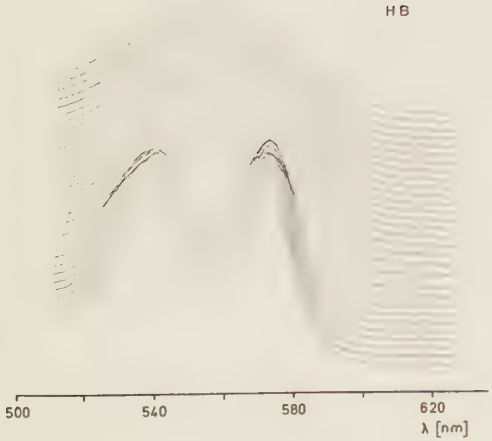


Abb. 28: Desoxygenierungsverlauf für Hämoglobin

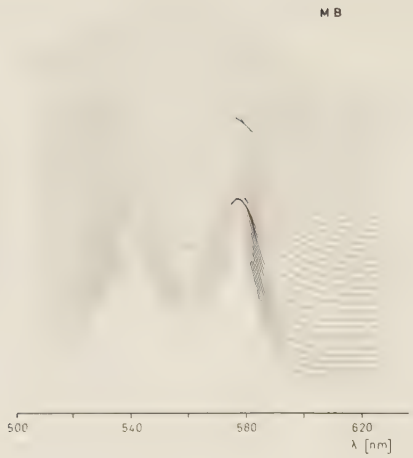


Abb. 29: Desoxygenierungsverlauf für Myoglobin

C.2.2. Streuungsmessungen

In diesem Kapitel sollen die Versuche vorgestellt werden, die gewissermaßen die Grundlage der vorliegenden Arbeit darstellen.
Es handelt sich hierbei um systematische Untersuchungen über das Absorptions- und Streuverhalten von klaren Lösungen und von Suspensionen. Alle Versuche wurden in 1 cm dicken Glasküvetten durchgeführt, und es wurde darauf geachtet, eine systematische Annäherung der Verhältnisse im Gewebe zu simulieren.

Der Sinn dieser Untersuchungsreihe lag darin, unter einer streng abgegrenzten Versuchsanordnung unser Modell der Zwei-Fluß-Theorie zu prüfen und gegebenenfalls eine genauere Aufschlüsselung der Versuche zu erhalten.
Durch die schrittweise erfolgte Komplizierung der Meßbedingungen war es möglich, die Anwendbarkeit dieser Auswertmethode genau zu studieren.
Als Absorptionsmedium diente das Hämoglobin und als Streuparameter wurden Polyacrylamidkapseln definierter Größe, sowie Mitochondrien- und Homogenatsuspensionen zugesetzt.

C.2.2.1. Eichreihen mit reinem Hämoglobin

Den Beginn der Messungen bildeten die Eichreihen an reinem Hämoglobin (Methode B.2.3.2.1.)
Da in klaren Lösungen keine Streuung vorhanden ist, erhält man hier reine Absorptionsspektren.
Trägt man die gemessenen Extinktionen gegen die zugehörigen Konzentrationen auf, so ergibt sich sowohl für die Messung in Transmission (Sterne) als auch für die gleiche Messung in Reflexion (Punkte) eine lineare Abhängigkeit zwischen Extinktion und Konzentration und beide Geraden schneiden den Nullpunkt. Das heißt, das Lambert-Beer-Gesetz ist unmittelbar anzuwenden.
Die steilere Kurve für Reflexionsmessungen ergibt sich aufgrund der Meßbedingungen (vergl. B.2.4.1. Transmissions- und Reflexionsphotometrie).
Diese Versuche dienten in erster Linie zur Überprüfung der Meßanordnung und der Reproduzierbarkeit.

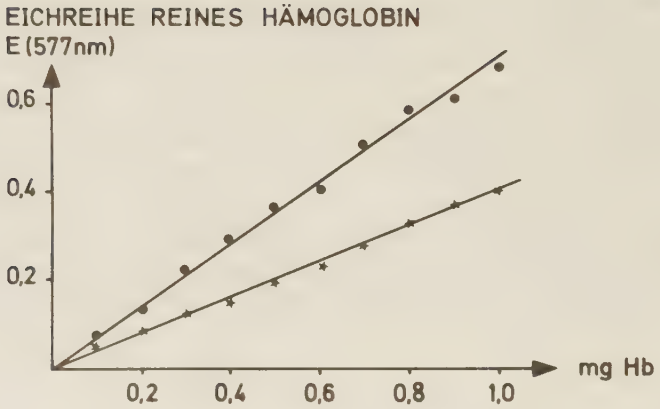


Abb. 30: Eichreihe mit reinem Hämoglobin gemessen in Transmission (Sterne) und Reflexion (Punkte)

C.2.2.2. Hämoglobineichreihen mit Polyacrylamidkapseln

Die ersten Streuungsuntersuchungen waren Eichreihen von Polyacrylamidkapseln definierter Größe mit Hämoglobin als Absorptionsmedium (Methode B.2.3.2.2.).
Es liegen hier streuende aber nicht absorbierende Partikel in einem absorbierenden aber nicht streuenden Medium vor. Da sowohl die Konzentration als auch die Größe der Kapseln und die Verdünnung des Hämoglobins bekannt waren, sind die Versuchsbedingungen genau definiert.
Auch hier wurden alle Messungen im durchfallenden und im reflektierten Licht ausgeführt. Ein Rührmechanismus verhinderte eine Sedimentation der Kapseln.
Die folgenden Abbildungen zeigen Eichreihen von drei verschiedenen Kapselgrößen (0.2/um, 5/um, 30/um).

Die Größen der Kapseln wurden nach bestimmten Gesichtspunkten ausgewählt: die erste Versuchsreihe sollte Streupartikel enthalten, die kleiner als die später zu messenden Mitochondrien sind; in einer zweiten Meßreihe wurden Kapseln benutzt, die den Mitochondriendurchmesser leicht übersteigen.
Die dritte Gruppe: die Polyacrylamidkapseln von 30/um Durchmesser entsprachen etwa den größten Partikeln, die man bei der Herstellung eines Gehirnhomogenates findet.
Um konstante Streubedingungen zu haben, wurden während jedes Versuches identische Kapselkonzentrationen in die Meßküvetten einpipettiert und mit steigenden Hämoglobinkonzentrationen versetzt. Die Variabilität der Polyacrylamidkapseln beträgt 60 - 70%, d.h. in dieser Prozentzahl finden sich die vorgegebenen Kapseldurchmesser exakt wieder.

Abb. 31: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Polyacrylamidkapseln - aufgenommen von Herrn Dr. K. Zierold, MPI für Systemphysiologie.

Folgende Kapselkonzentrationen wurden untersucht:

0,2/um-Kapseln	100 mg/ml und 75 mg/ml
5/um-Kapseln	50 mg/ml und 25 mg/ml
30/um-Kapseln	10 mg/ml und 5 mg/ml

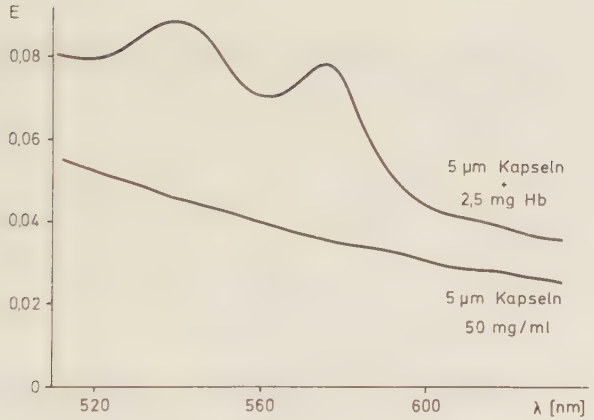


Abb. 32: Darstellung eines Transmissionsspektrums für Polyacrylamidkapseln (5/um - 50 mg/ml) in reiner Pufferlösung und unter Zusatz von 2,5 mg Hämoglobin

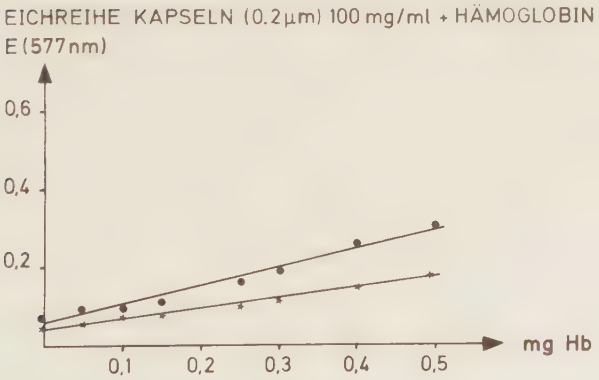


Abb. 33: Darstellung einer Polyacrylamidkapseleichreihe (Ø - 0,2/um) mit Hämoglobin in Transmission (Sterne) und Reflexion (Punkte)

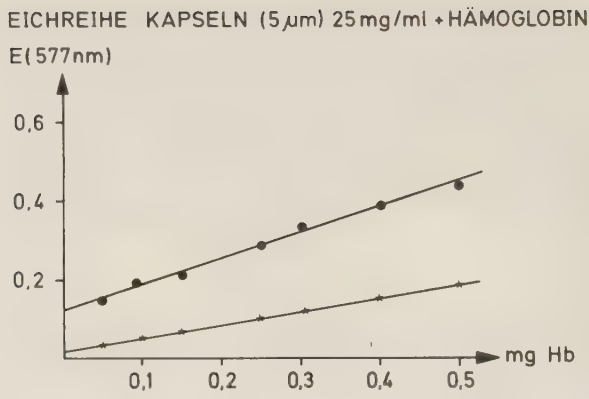


Abb. 34: Darstellung einer Polyacrylamidkapseleichreihe (Ø = 5 µm) mit Hämoglobin in Transmission (Sterne) und Reflexion (Punkte)

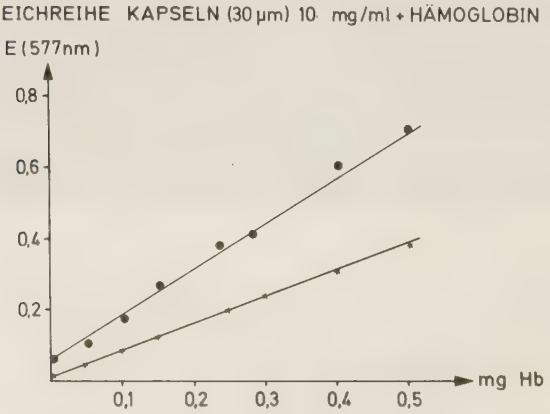


Abb. 35: Darstellung einer Polyacrylamidkapseleichreihe (Ø - 30 µm) mit Hämoglobin in Transmission (Sterne) und Reflexion (Punkte)

Im Rahmen der Auswertung wurden zunächst für jeden Versuch die Extinktionen des Reflexionsspektrums gegen die Extinktionen des zugehörigen Transmissionsspektrums aufgetragen (vergl. B.2.4.). Ergibt sich bei dieser Auftragung eine Gerade, so deutet dies darauf hin, daß keine Streuung vorhanden ist. Stellt die Transformation eine gekrümmte Linie dar, die aber nicht aufgespalten ist, so weist dies auf eine konstante Streuung hin. Der Grad der Krümmung definiert die Größe des Streueinflusses.

Im Kapitel B.2.4. wurde bereits ein Transformationsschema vorgestellt.
In dieses Schema wurden die Meßdaten von Transmissions- und Reflexionsspektren gegeneinander aufgetragen. Aus dieser Darstellung können bereits gute Aussagen über den Absorptionskoeffizienten a und den Streukoeffizienten s gemacht werden.

Die Abb. 36 zeigt eine solche Transformation für einen Versuch mit 5/um-Kapseln. Ein Kontrollwert nur mit Hämoglobinzusatz, jedoch ohne Zugabe von Streupartikeln liegt an der Geraden $s = 0$.

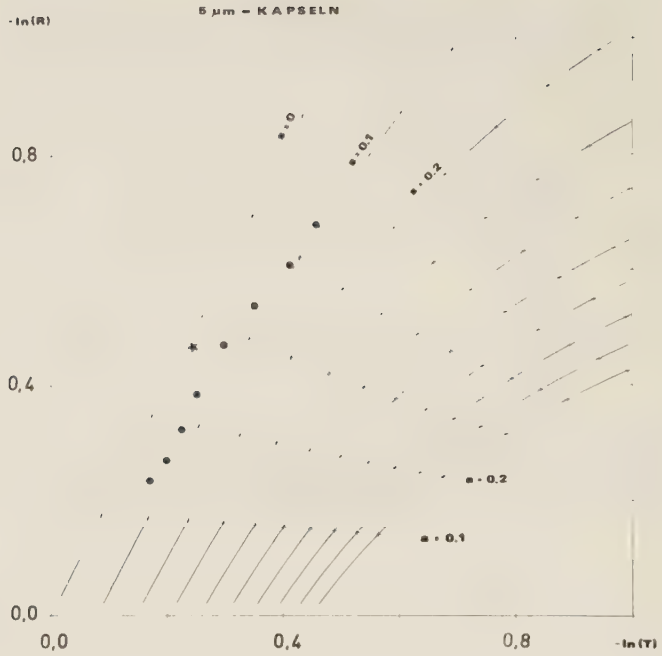


Abb. 36: Darstellung einer Transformation zwischen Reflexionsspektrum und Transmissionsspektrum aus einer Polyacrylamidkapseleichreihe (Ø = 5/um) mit Hämoglobin

Die Anwendung der Zwei-Fluß-Theorie erlaubt es nun, bei bekannten Transmissions- und Reflexionsspektren das wahre Absorptionsspektrum mit dem zugehörigen Streuspektrum zu berechnen und somit für jeden Meßpunkt einen Absorptionswert und einen Streuwert zu erhalten.
Die folgenden Abbildungen zeigen die wahren Absorptionsspektren und die berechneten Streuspektren einer Hämoglobineichreihe mit Polyarcylamidkapseln. Für die Darstellung wurden 5/um Kapseln in zwei verschiedenen Konzentrationen ausgewählt. Man sieht deutlich Unterschiede in der Streuung.

Während man bei einer Kapselkonzentration der 5/um Partikel von 25 mg/ml noch eine wellenlängenunabhängige und damit geringe Streuung vorfindet, zeigt sich bei der höheren Konzentration (50 mg/ml) eine Wellenlängenabhängigkeit der berechneten Streuung.
Die Absorptionsspektren wurden jeweils aus gemessenen Transmissions- und Reflexionsspektren ermittelt.
Sie sind, ausgehend von einem reinen Kapselspektrum ohne Hämoglobinzusatz, nach steigenden Hämoglobinkonzentrationen dargestellt.
Hierbei sieht man eine scheinbare leichte Eigenabsorption der Kapseln, die einen Anstieg zu kürzeren Wellenlängen aufweist.

Dies begründet sich in der Tatsache, daß seitlicher Verlust durch Streuung bisher in diesem Modell noch nicht erfaßt ist und Strahlungsverluste wie Absorptionen behandelt werden.

Untersucht man Kapseln verschiedener Größe und verschiedener Konzentrationen, so stellt man fest, daß sehr unterschiedliche Grundextinktionen (bedingt durch seitliche Strahlungsverluste) auftreten können. Dies zeigt sich auch in den voneinander abweichenden Ausgangswerten der Polyacrylamidkapseleichreihen mit Hämoglobin (Abbildungen 33 - 35).

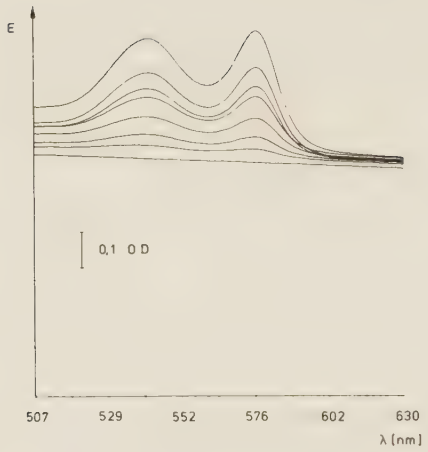


Abb. 37:
Wahre Absorptionsspektren einer Hämoglobineichreihe mit Polyacrylamidkapseln (Ø = 5/um, 25 mg/ml)

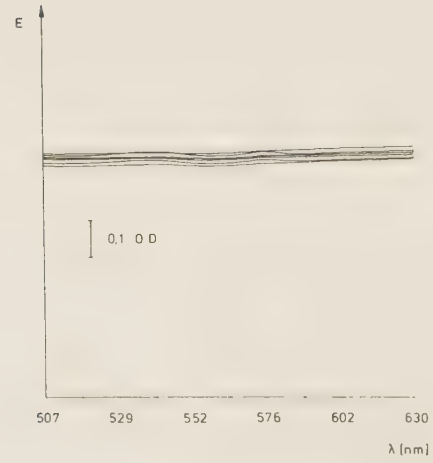


Abb. 38:
Zugehöriges Streuspektrum der gleichen Eichreihe (Ø = 5/um, 25 mg/ml)

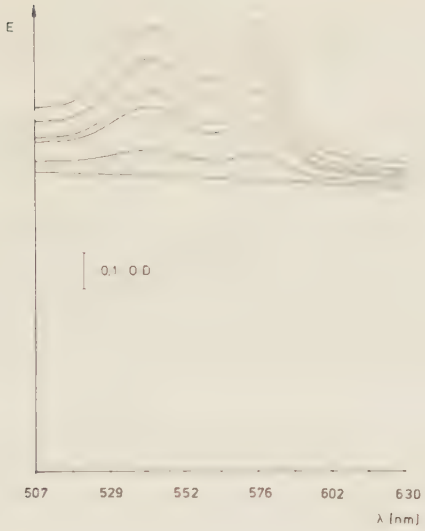


Abb. 39:
Wahre Absorptionsspektren einer Hämoglobineichreihe mit Polyacrylamidkapseln (Ø = 5/um, 50 mg/ml)

Abb. 40:
Zugehöriges Streuspektrum der gleichen Eichreihe (Ø = 5/um, 50 mg/ml)

C.2.2.3. Hämoglobineichreihen mit Gehirnmitochondrien

Nachdem sich das Modell für den einfachen Fall der Polyacrylamidkapseln als tauglich erwiesen hat, erfolgte nun der Test für biologische Komponenten.
Die schrittweise Annäherung der Verhältnisse des Gewebes wurde fortgesetzt durch Experimente an isolierten Mitochondrien. Auch hier wurden entsprechend den Kapselversuchen Verdünnungsreihen mit Hämoglobin im durchfallenden und im reflektierten Licht durchgeführt und nach der genannten Methode ausgewertet (B.2.4.).
Die Mitochondrien wurden nach einer Methode von L. Mela isoliert (B.2.1.2.) und ihre Reinheit elektronenmikroskopisch überprüft (B.2.2.2.). Die durchschnittliche Partikelgröße betrug 1 - 2/um (B.2.2.1.).
Abbildung 38 zeigt eine Eichreihe mit Hämoglobin für Transmission (Sterne) und Reflexion (Punkte). Die Verschiebung der beiden Meßgeraden zu höheren Extinktionswerten - im Gegensatz zu Untersuchungen an klaren Lösungen und den Polyacrylamidkapseln - zeigte bereits, daß sich hier die Streuung stärker auf die Einzelspektren auswirkt.
Das Meßsignal des Hämoglobins war bei diesen Spektren so stark, daß die Eigenabsorption der Cytochrome der Mitochondrien vollständig überdeckt wurde.

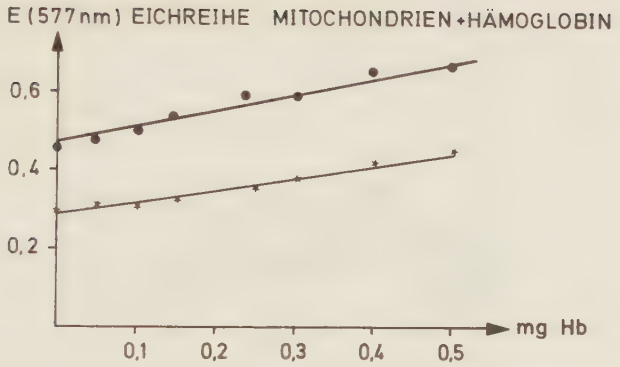


Abb. 41: Darstellung einer Mitochondrieneichreihe (Ø = 1 - 2/um) mit Hämoglobin in Transmission (Sterne) und Reflexion (Punkte)

Das Auswerteverfahren war identisch mit dem bereits unter C.2.2. beschriebenen Vorgehen. Es konnte ebenso eine Auftrennung von Streuspektren und Absorptionsspektren für alle Meßpunkte ermittelt werden. Im Gegensatz zu der nur schwach ausgeprägten Streukurve bei den Kapseln, findet man hier schon einen stärkeren Einfluß - besonders in Richtung zum kurzwelligeren Licht, bedingt durch die stärkere Trübung der Mitochondriensuspension.

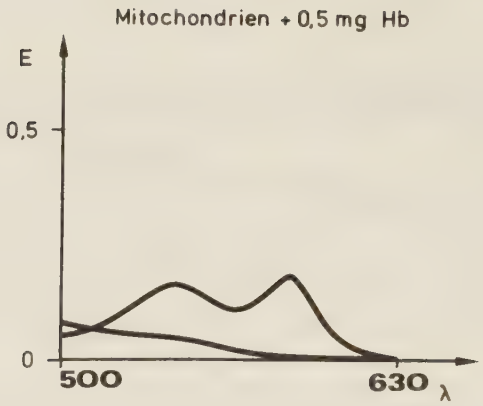


Abb. 42: Auftrennung eines Streu- und Absorptionsspektrums für Gehirnmitochondrien unter Zusatz von 0,5 mg Hämoglobin

Der leichte Knick in der Streukurve weist noch auf einen geringen Fehler in der Auswertungsmethode hin, der vermutlich mit der Vernachlässigung der seitlichen Streuung zu begründen ist.

C.2.2.4. Hämoglobineichreihen mit Gehirnhomogenaten

Der zweite Test des Modells der Zwei-Fluß-Theorie wurde an Gehirnhomogenaten ausgeführt.
Wie bereits aus den histologischen- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen (C.1.1.) bekannt war, liegt hier eine Größenverteilung der Einzelpartikel von 1 - 30/um vor. Entsprechend dem bewährten Untersuchungsschema wurden ebenfalls Eichreihen mit Hämoglobin durchgeführt und zwar für Transmission und Reflexion (Methode B.2.3.2.4.).
In den beiden nächsten Abbildungen sollen die Spektren vorgestellt werden, wie sie sich bei den Einzelmessungen darstellen. Dabei sind die Spektren nach steigender Hämoglobinkonzentration aufgezeichnet. V gibt den Verstärkungsfaktor der Aufnahmen an. Bei der Darstellung ist zu beachten, daß die Wellenlängenskala den umgekehrten Verlauf zu den übrigen Abbildungen hat.

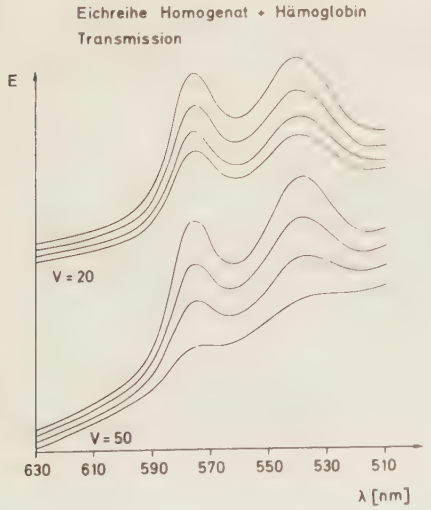


Abb. 43: Spektren einer Homogenateichreihe in Transmission
V = Verstärkungsfaktor

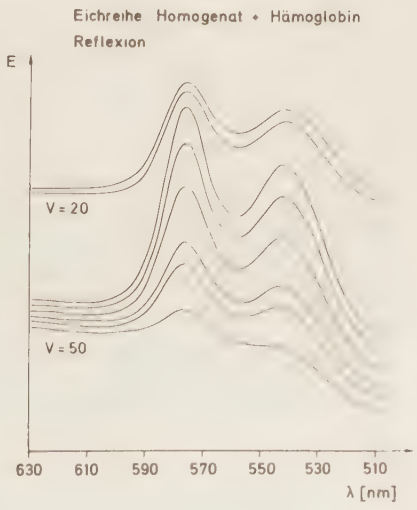


Abb. 44: Spektren einer Homogenateichreihe in Reflexion

Trägt man die Extinktionen des ersten Peaks (577 nm) gegen die zugesetzten Hämoglobinkonzentrationen auf, so erhält man analog zu den vorangegangenen Messungen die beiden Eichgeraden für Transmission (Sterne) und Reflexion (Punkte).

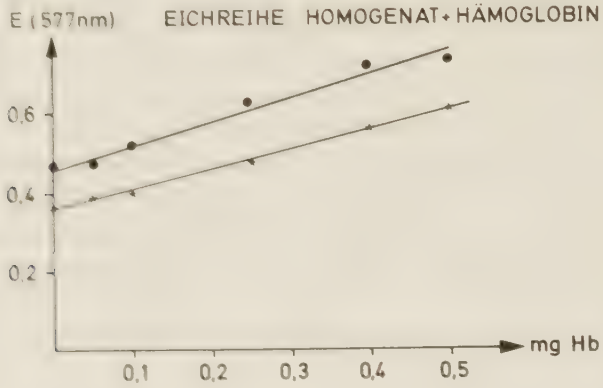


Abb. 45: Darstellung einer Gehirnhomogenateichreihe mit Hämoglobin in Transmission (Sterne) und Reflexion (Punkte)

Der vom folgende Test der Zwei-Fluß-Theorie konnte auch hier aufschlußreiche Ergebnisse liefern. Wie bereits zu vermuten war, ergab die Auftrennung von Streuspektrum und Absorptionsspektrum einen starken Einfluß der Streuung für Gehirnhomogenate.
Die nächste Abbildung zeigt diese Auftrennung von Absorption und Streuung für einen Hämoglobinzusatz von 0.9 mg.

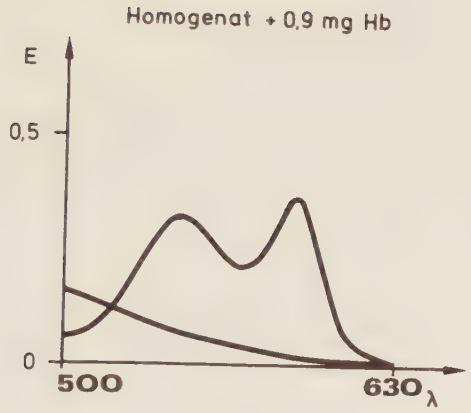


Abb. 46: Auftrennung eines Streu- und Absorptionsspektrums für Gehirnhomogenate unter Zusatz von 0,9 mg Hämoglobin

Nach den hier vorgestellten Versuchen zur Untersuchung des Streuverhaltens von Polyacrylamidkapseln und biologischen Komponenten wie Gehirnmitochondrien und Gehirnhomogenaten und deren Auswertung mit Hilfe der Zwei-Fluß-Theorie konnte diese Versuchsreihe abgeschlossen werden. Aufgrund der Tatsache, daß das Auswertungsmodell neue Befunde geliefert hat, konnte nun mit der Anwendung auf hämoglobinfreie Gehirnmitochondrien, Gehirnschnitte und Organspektren von perfundierten Gehirnen begonnen werden, um auf diese Weise eine Auftrennung der Cytochromabsorptionsspektren von den jeweiligen Streuspektren zu erhalten.

C.2.3. Aufnahmen von biologischen Komponenten

C.2.3.1. Gehirnmitochondrienspektren

Die Frage in wieweit das beschriebene Auswerteverfahren auch gültig ist, wenn sich der Farbstoff in den Partikeln befindet, wurde an Gehirnmitochondrien untersucht. Die Absorption erfolgte hierbei durch die Cytochrome der Atmungskette.

Die Mitochondrien wurden, wie unter B.2.1.2. beschrieben, isoliert und ihre Güte überprüft (B.2.2.1. und B.2.2.2.).

An gut gereinigten und hämoglobinfreien Mitochondriensuspensionen wurden mittels des Rapidspektrometers die Absorptionsspektren der Cytochrome in einem Wellenlängenbereich von 510 - 630 nm aufgenommen. In diesem Bereich liegen die α+ß-Banden der Cytochrome aa_3, b und c, deren Einzelspektren bereits dargestellt wurden (C.2.1.1.).

Wie unter B.2.3.3.1. beschrieben erfolgten zunächst Messungen von Mitochondriensuspensionen in der 1 cm-Küvette.
Die Proteinkonzentration betrug: 35,3 mg/Protein/ml $\pm$ 4,9 (n = 17).
Es wurden hierzu oxidierte, reduzierte und Differenzspektren aufgenommen.

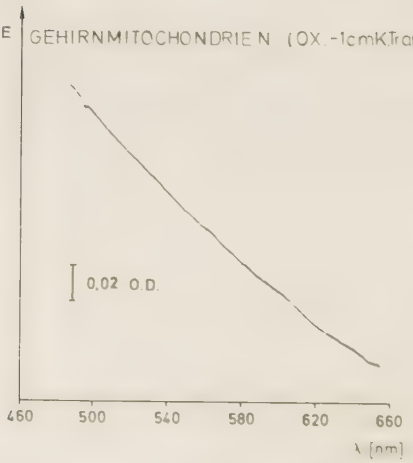


Abb. 47: Mitochondriensuspension - oxidiertes Spektrum - Transmission (1 cm-Küvette)

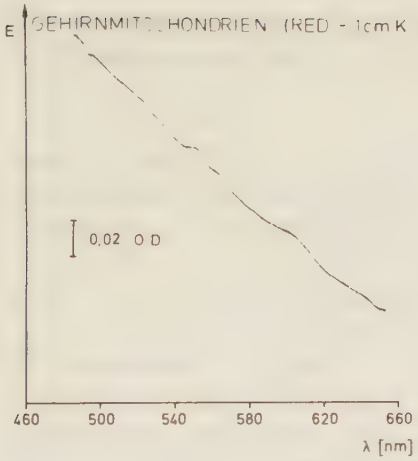


Abb. 48: Mitochondriensuspension - reduziertes Spektrum - Transmission (1 cm-Küvette)

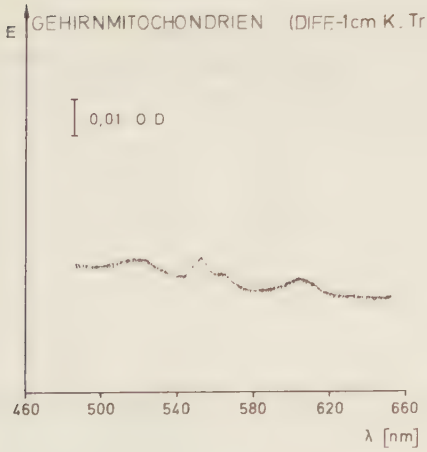


Abb. 49: Mitochondriensuspension - Differenzspektrum - Transmission (1 cm-Küvette) (gemessen: red/ox)

Wie die Abbildungen 47 - 49 zeigen, sind die Absorptionsbanden der Cytochrome im oxidierten und reduzierten Spektrum derart von dem Spektrum der Streuung überlagert, daß man deren Existenz nur noch erahnen kann. Eine Information über die Cytochrome läßt sich erst durch Kompensation der Streuung

mittels Differenzbildung zwischen reduziertem und oxidiertem Spektrum erhalten. Abbildung 49 zeigt das Differenzspektrum bei doppelter Verstärkung.

Eine andere Möglichkeit, experimentell aussagekräftigere Spektren zu erhalten, ist die Erhöhung der Mitochondrienkonzentration bei gleichzeitiger Veränderung der Schichtdicke.

Hierzu wurden 1 mm-Küvetten verwandt, in die unverdünnte Mitochondrienpellets hineingeführt wurden.
Die folgenden Abbildungen 50 - 52 zeigen die entsprechenden Spektren, die äquivalent zu den Messungen in der 1 cm-Küvette aufgenommen wurden. Es zeigt sich eine deutliche Verbesserung des Absorptionssignals, obwohl sich dennoch die Streuung durch eine Extinktionsverschiebung bemerkbar macht.

Die Messungen an der 1 mm-Küvette bieten jedoch gute Möglichkeiten für Untersuchungen an isolierten Mitochondrien, ohne sich ausschließlich auf Differenzspektren (Abb. 52) stützen zu müssen.

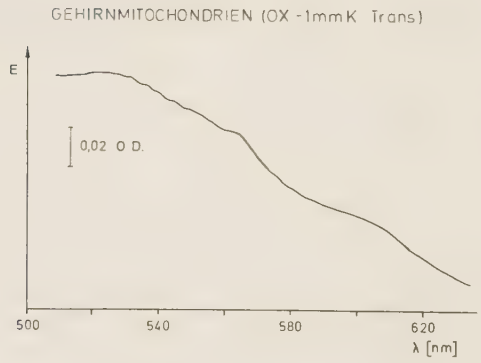


Abb. 50: Mitochondriensuspension - oxidiertes Spektrum - Transmission (1 mm-Küvette)

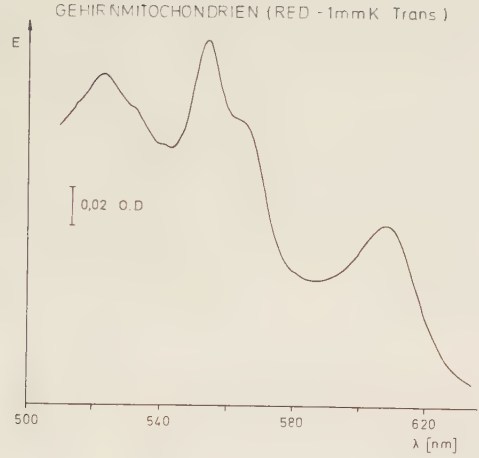


Abb. 51: Mitochondriensuspension - reduziertes Spektrum - Transmission (1 mm-Küvette)

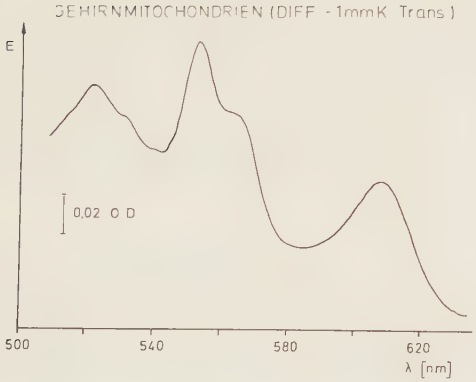


Abb. 52: Mitochondriensuspension - Differenzspektrum - Transmission (1 mm-Küvette) (gemessen: red / ox)

Die folgenden Untersuchungen wurden jeweils in Transmission und Reflexion durchgeführt, da es sich gezeigt hatte, daß beide Spektren zu einer quantitativen Bestimmung benötigt werden (C.2.2.).

In den nächsten Experimenten wurden bestimmte Zustände der Atmungskette dargestellt, in dem die Mitochondrien mit verschiedenen Blockern der Atmungskette, bzw. Reduktionsmitteln behandelt wurden. Dabei kam es zum Einen auf die Darstellung von vollständig oxidierten oder reduzierten Cytochromen und zum Anderen auf eine etwaige Wellenlängenverschiebung der Absorptionsmaxima unter dem Einfluß eines Blockers, an.

Alle Experimente wurden in einer geschlossenen 1 mm-Küvette an Mitochondrienpellets durchgeführt, denen folgende Konzentrationen von Blockern beigemischt waren:

Mitochondrien + Amytal (5/ul 1 $mol \cdot l^{-1}$)
Mitochondrien + Antimycin a (5/ul 100/$umol \cdot l^{-1}$)
Mitochondrien + Cyanid (5/ul 10 $mmol \cdot l^{-1}$)
Mitochondrien + Na-Dithionit (5/ul 1 $mol \cdot l^{-1}$)
Mitochondrien ohne Zusatz, reduziert

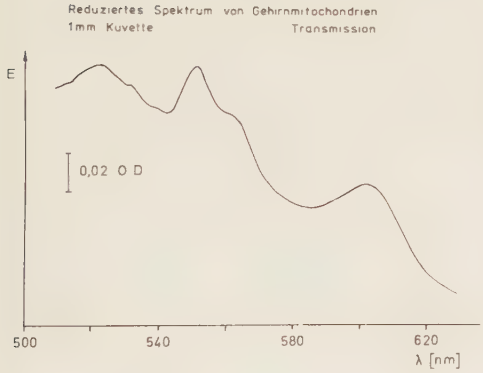
Amytal führt zu einer vollständigen Oxidation der Cytochrome. Antimycin A greift als Blocker zwischen Cytochrom b und Cytochrom c ein und führt zu einer Reduktion von Cytochrom b, während die Cytochrome c und aa_3 oxidiert bleiben. Cyanid und Na-Dithionit bewirken eine vollständige Reduktion aller Atmungsenzyme.

Dies ist für spätere Untersuchungen am perfundierten Organ von Bedeutung, da hier anhand von Bezugsspektren (Amytal und Na-Dithionit) die jeweiligen Oxigenierungsgrade der Atmungskette während der Perfusion bzw. bei Perfusionsstop ermittelt werden.

Eine Wellenlängenverschiebung der Absorptionsmaxima um etwa 2 nm findet jedoch zwischen den jeweiligen Transmissions- und Reflexionsspektren statt, d.h. das Reflexionsspektrum ist um 2 nm zur höheren Wellenlänge verschoben.

Dies ist jedoch ein Phänomen, das mit dem unterschiedlichen Einfluß der Streuung bei Transmission und Reflexion zu erklären ist und auch durch Simulationsexperimente nachzuweisen ist.

Die folgenden Abbildungen zeigen jeweils Spektrenpaare von Transmission und Reflexion, die Extinktionsskala gibt relative Einheiten wieder.



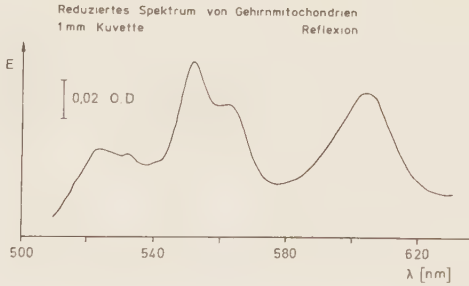
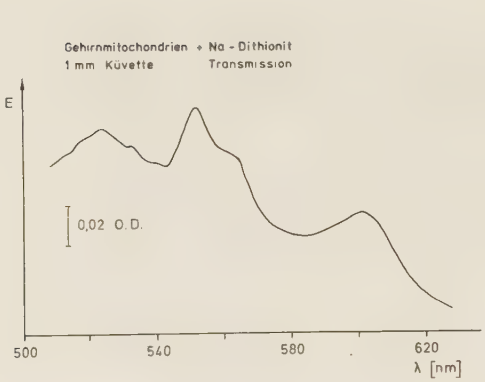


Abb. 53: An der Luft reduziertes Kontrollspektrum gemessen in Transmission und Reflexion



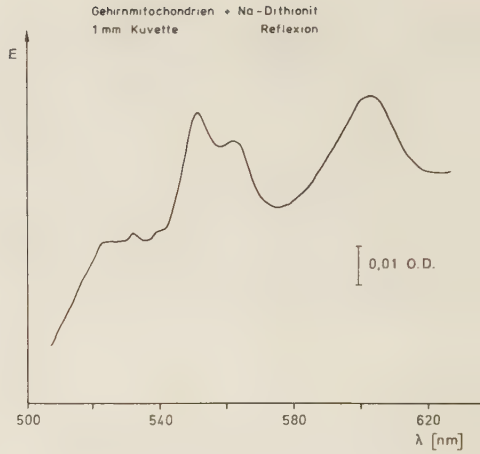
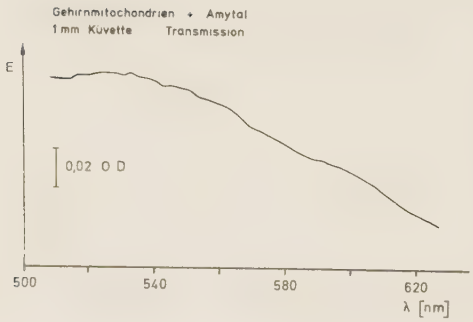


Abb. 54: Reduziertes Bezugspektrum in Transmission und Reflexion



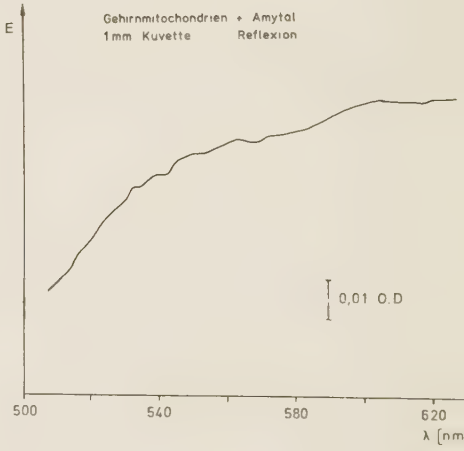
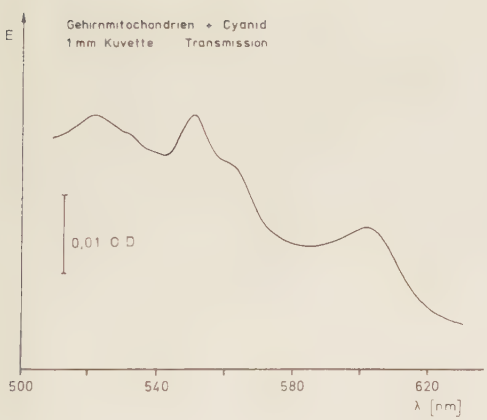


Abb. 55: Oxidiertes Bezugspektrum in Transmission und Reflexion



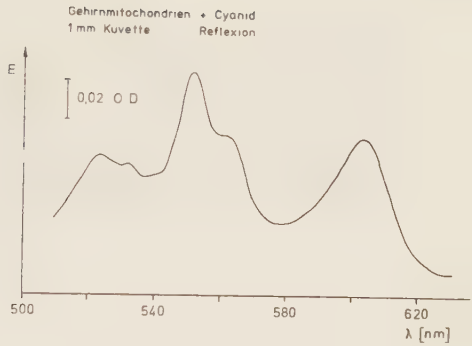
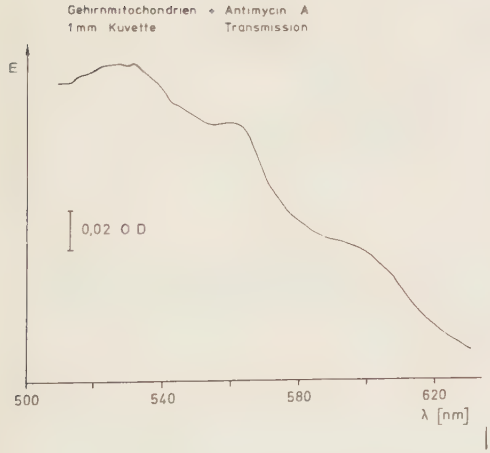


Abb. 56: Reduzierte Cytochromspektren durch Vergiftung mit Cyanid



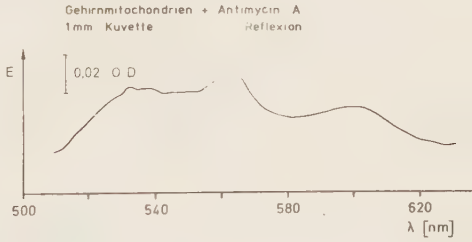


Abb. 57: Auftrennung der Cytochromspektren durch Antimycin A (Cytochrom b ist reduziert, Cytochrom aa_3 und Cytochrom c sind oxidiert)

Der rechnerische Weg, entsprechend der Zwei-Fluß-Theorie, der zu einer Trennung von Streu- und Absorptionsverhalten führt, wurde in Kapitel C.2.2. ausführlich dargestellt.
Abbildung 58 zeigt die zur Auswertung verwandten Cytochromspektren in vollständiger Reduktion über einen Wellenlängenbereich von 510 - 630 nm.

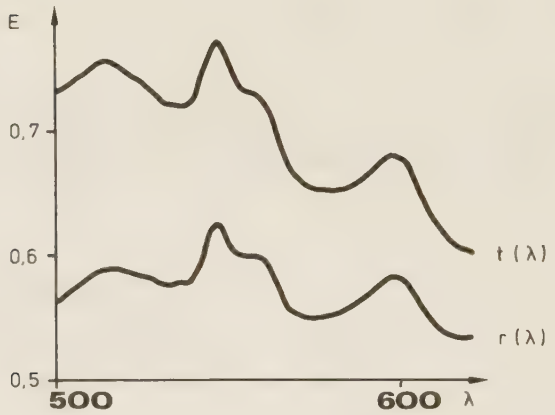


Abb. 58: Darstellung eines reduzierten Transmissions- und Reflexionsspektrums von hämoglobinfreien Gehirnmitochondrien (1 mm-Küvette)

Die Auswertung nach der Zwei-Fluß-Theorie (B.2.4.) ergab auch hier eine Auftrennung von Absorptionsspektrum und Streuspektrum.
Die Abbildung zeigt deutlich den starken Einfluß der Streuung und die damit verbundene Deformierung der Spektren bei der Messung von Transmission und Reflexion.

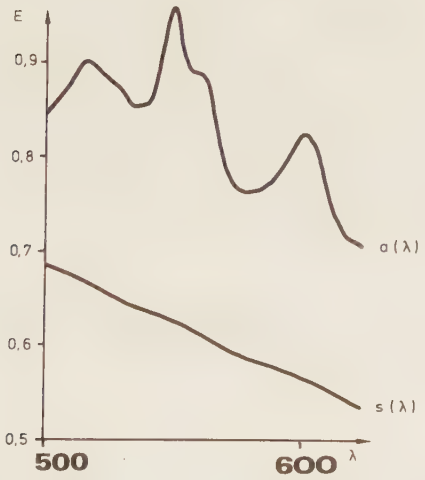


Abb. 59: Auftrennung eines Streu- und Absorptionsspektrums für Gehirnmitochondrien (1 mm-Küvette)

C.2.3.2. Gehirnhomogenatspektren

Analog zu den Versuchen an Gehirnmitochondrien wurden auch von Homogenaten oxidierte, reduzierte und Differenzspektren in Küvetten von 1 cm und 1 mm Schichtdicke aufgenommen.

Es zeigt sich in ähnlicher Weise der Einfluß der Streuung, besonders bei den Messungen in der 1 cm-Küvette.

Die Abbildungen 60 - 65 zeigen die Spektren der jeweiligen Homogenatsuspensionen. Im Gegensatz zu den Mitochondrien, die aufgrund der zahlreichen Reinigungsschritte hämoglobinfrei waren, zeigt sich hier deutlich eine Überlagerung des Hämoglobinspektrums über das bekannte Cytochromspektrum. Dies wird vor allem in den oxidierten und in den Differenzspektren deutlich. Dieser Einfluß variiert mit der Konzentration des Hämoglobins und kann durch vorherige Organperfusion eliminiert werden. Die durchschnittlichen Proteinkonzentrationen der Homogenate betrugen zwischen

6.5 - 10 mg Prot./ml Homogenatsuspension bzw.
65 - 100 mg Prot./g Feuchtgewicht.

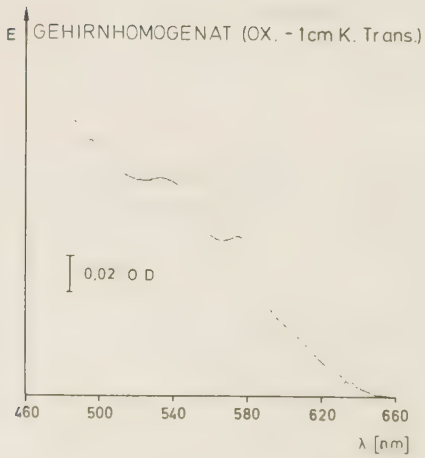


Abb. 60: Gehirnhomogenatsuspension oxidiertes Spektrum - Transmission (1 cm-Küvette)

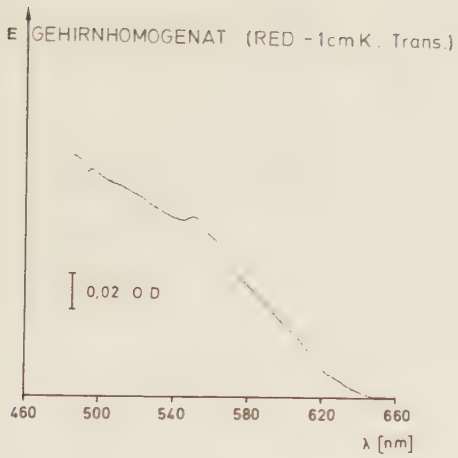


Abb. 61: Gehirnhomogenatsuspension - reduziertes Spektrum - Transmission (1 cm-Küvette)

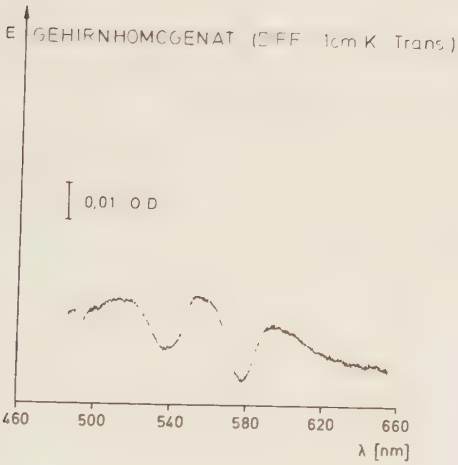


Abb. 62: Gehirnhomogenatsuspension - Differenzspektrum - Transmission (1 cm-Küvette) (gemessen: red / ox)

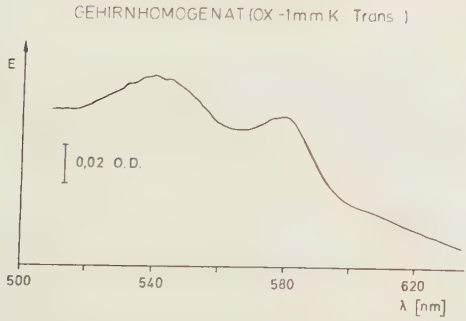


Abb. 63: Gehirnhomogenatsuspension - oxidiertes Spektrum - Transmission (1 mm-Küvette)

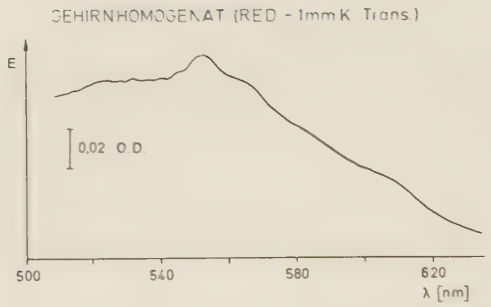


Abb. 64: Gehirnhomogenatsuspension - reduziertes Spektrum - Transmission (1 mm-Küvette)

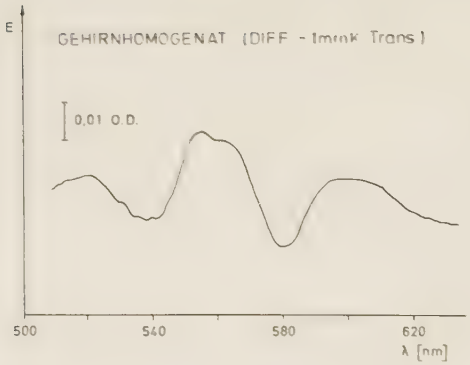


Abb. 65: Gehirnhomogenatsuspension - Differenzspektrum - Transmission (1 mm-Küvette) (gemessen: red / ox)

Entsprechend der in Kapitel C.2.3.1. gezeigten Auswertung nach der Zwei-Fluß-Theorie, wurden hier ebenso die Gehirnhomogenatspektren auf ihr Streu- und Absorptionsverhalten untersucht.

Dazu werden die gemessenen Transmissions- und Reflexionsspektren in der 1 mm-Küvette herangezogen (Abb. 66)

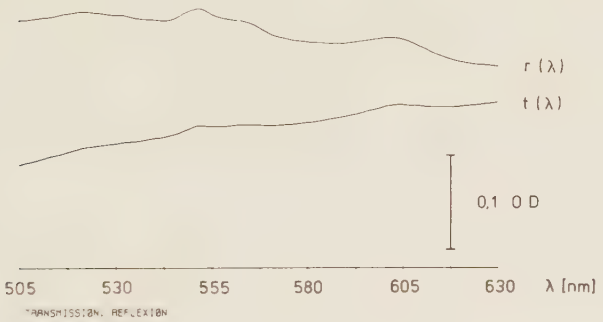


Abb. 66: Darstellung eines reduzierten Transmissions- und Reflexionsspektrums von einem hämoglobinfreien Gehirnhomogenat (1 mm-Küvette)

Die Auswertung nach der Zwei-Fluß-Theorie (B.2.4.) ergibt auch hier eine Auftrennung von Absorptions- und Streuspektren.

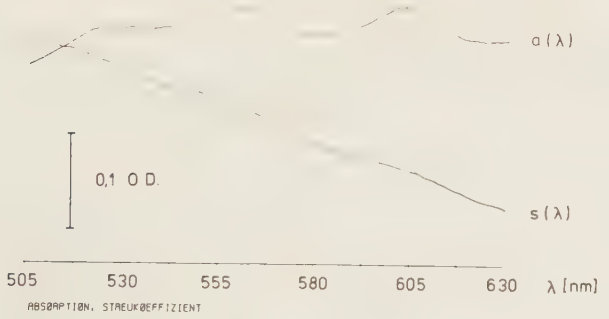


Abb. 67: Auftrennung eines Streu- und Absorptionsspektrums für hämoglobinfreie Gehirnhomogenate (1 mm-Küvette)

C.2.3.3. Gehirnschnittspektren

In Analogie zu den vorangegangenen Untersuchungen an hämoglobinfreien Gehirnmitochondrien erfolgten nun entsprechende Messungen an hämoglobinfreien Gehirnschnitten.
In Kapitel B.2.3.3. wurde bereits beschrieben, wie die Gehirne perfundiert, die Schnitte angefertigt und vorbehandelt wurden, ehe von ihnen Transmissions- und Reflexionsspektren aufgenommen werden konnten.
Es handelt sich hierbei um 400 - 500/um dicke Gehirnschnitte der Großhirnrinde.
Die beiden folgenden Abbildungen stellen die gemessenen Spektren der Cytochromabsorptionsbanden in Transmission und Reflexion für den Wellenbereich von 510 - 630 nm und die daraus berechneten Absorptions- und Streuspektren dar.

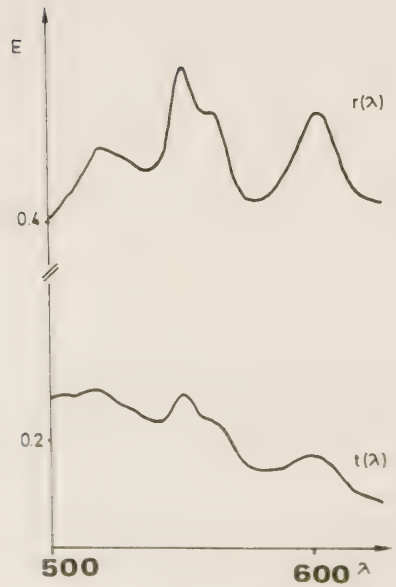


Abb. 68: Darstellung eines reduzierten Transmissions- und Reflexionsspektrums für perfundierte Gehirnschnitte

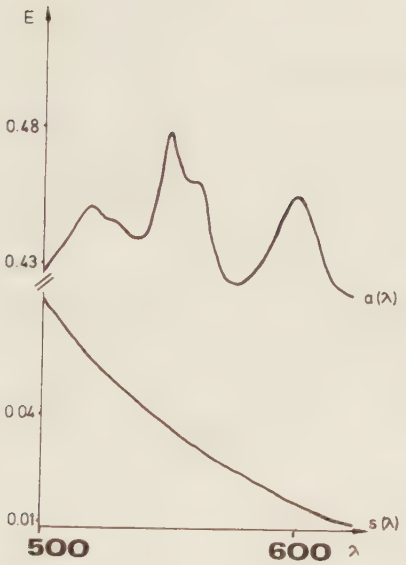


Abb. 69: Auftrennung eines Streu- und Absorptionsspektrums für perfundierte Gehirnschnitte

Mit dieser Serie an Gehirnschnitten wurde das Projekt der Modelluntersuchungen mit der schrittweisen Annäherung der Verhältnisse des Gewebes abgeschlossen.
Es hatte sich gezeigt, daß es unter den vorgegebenen Bedingungen möglich ist, mit Hilfe der Zwei-Fluß-Theorie eine Analyse der in Transmission und Reflexion gemessenen Spektren vorzunehmen und daraus die wahren Absorptions- und Streuspektren zu berechnen. Dies gilt sowohl für das System "Partikel in Farbstofflösung" als auch für "Farbstoff im Partikel".

C.2.4 Organspektren

C.2.4.1. Gehirnperfusionen

In diesem Kapitel sollen die Ergebnisse der unter B.2.4.2. vorgestellten Auswertemethoden für Messungen am intakten Organ gezeigt werden.

Um den störenden Einfluß des Hämoglobins zu vermeiden, das seine Absorptionsmaxima bei 577 nm und 541 nm hat und damit die interessierenden Cytochrombanden durch sein wesentlich stärkeres Signal überdeckt, wurden alle photometrischen Untersuchungen am blutfrei perfundierten Gehirn durchgeführt.

Die Methode der Gehirnperfusion für Meerschweinchen wurde im Kapitel B.2.1.3. beschrieben.
Als Perfusionsmedium diente eine Macrodexlösung mit folgenden Zusätzen:
- $NaHCO_3$ (20 $nmol \cdot l^{-1}$)
- Papaverinhydrochlorid (Ausgangskonzentration 4 mg/100 ml, davon verwandt - 0,8 ml/500 ml Lösung)
- Liquemin 25000 (0,15 ml/100 ml Lösung)

Diese Mischung erlaubte eine optimale Weitstellung der Gefäße und der Liqueminzusatz beugte einer möglichen Blutgerinnung vor.
Durch $NaHCO_3$-Zugabe wurde ein pH-Wert von 7,80 eingestellt. Das Perfusat wurde mittels eines Scheibenoxygenators mit Carbogen begast und gleichzeitig über einen Thermostaten auf 18°C gekühlt.
Nach Begasen mit Carbogen betrug der pH-Wert des Perfusats 7,20.

Nach der Äquilibrierung im Scheibenoxygenator betrug der Sauerstoffpartialdruck im Mittel:

pO_2 = 630 mm Hg ≙ 83,9 kPa und der

pCO_2 = 55 mm Hg ≙ 7,3 kPa.

Messungen des Perfusats nach Durchlauf der Perfusion zeigten noch einen Sauerstoffdruck von

pO_2 = 400 mm Hg ≙ 53,3 kPa einen

pCO_2 = 55 mm Hg ≙ 7,3 kPa und einen pH von 7,20.

Der Gesamtperfusionsdurchlauf lag bei 30 ml/min und einem Perfusionsdruck von 80 - 130 mm H_2O, Gehirngewicht = 3 - 3,5 g. Die Temperaturmessungen an der Gehirnoberfläche ergaben 18°C. Diese niedere Temperatur ist notwendig, um eine ausreichende Sauerstoffversorgung des Gehirns zu gewährleisten.

Ödeme des Gehirns kamen bei dieser Anordnung und Zusammensetzung des Perfusats innerhalb von 1 - 1 1/2 Stunden Perfusionsdauer nicht vor.
Versuchstiere, deren Gehirnoberfläche beschädigt oder deren Perfusionsablauf nicht einwandfrei war, wurden ausgeschlossen.

Die Untersuchungen der Atmungsenzyme wurden nach folgendem Schema durchgeführt:

a) während der Perfusion (Abb. 70)
   die Cytochrome lagen hier in einem mittleren Oxidationszustand von 93% vor.
b) Perfusionsstop (Abb. 71)
   durch Abklemmen des Perfusionsflusses erfolgte eine allmähliche Reduktion der Cytochrome. Die Gesamtreduktionsdauer lag bei ca. 10 min, dabei wurden unterschiedliche Kinetiken für Cytochrom aa_3 sowie b und c gefunden (siehe Einzelbereichsauswertung Abb. 75).
c) Fortlauf der Perfusion
   bis eine ausreichende Sauerstoffversorgung wiederhergestellt worden war.
d) Vollständig oxidiertes Bezugsspektrum
   durch Zusatz von 2 ml Amytal (1 $mol \cdot l^{-1}$) zur Perfusionslösung.

e) Fortlauf der Perfusion
   zum Auswaschen des Amytalzusatzes.
f) Vollständig reduziertes Bezugsspektrum
   durch Zusatz von 2 ml Na-Dithionit ($1 mol \cdot l^{-1}$) zur Pufferlösung

Die Reihenfolge der Bezugsspektrenaufnahmen wurde nach ihrer Auswaschfähigkeit gewählt. Es hatte sich gezeigt, daß sich Amytal völlig auswaschen läßt, nach einem Zusatz von Na-Dithionit jedoch keine weiteren Spektren anderer Art darzustellen sind.
Der Abstand des Lichtleiters zur Organoberfläche betrug 1 mm. Die Aufnahmen erfolgten am Rapidspektrometer T 13/3 bei schneller Übernahme mit Schwingspiegel, d.h. 50 Spektren pro Sekunde und über einen Wellenlängenbereich von 510 - 630 nm (B.2.3.4.1.).
Die Daten wurden auf Magnetbändern gespeichert.

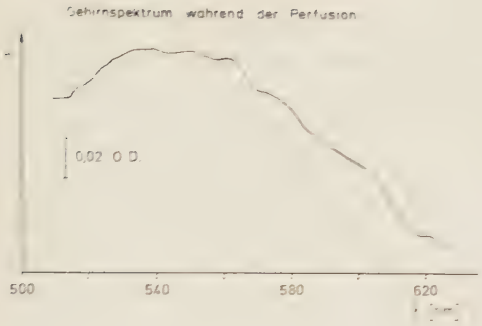


Abb. 70: Darstellung eines Reflexionsspektrums der perfundierten Gehirnoberfläche (Oxidationsgrad der Cytochrome = 93 %)

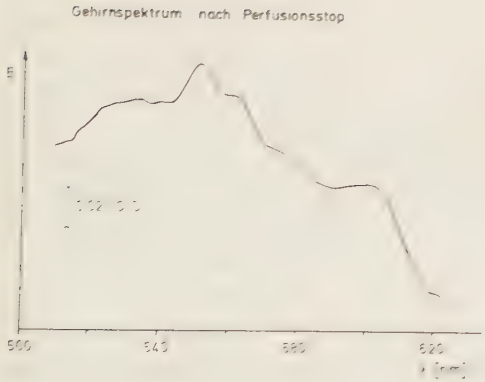


Abb. 71: Darstellung eines Reflexionsspektrums derselben Gehirnoberfläche nach einem Perfusionsstop von 4 min. (Oxidationsgrad der Cytochrome = 60 %)

Die Auswertung erfolgte zunächst nach der Zwei-Fluß-Theorie von Kubelka und Munk (Abb. 72).
Hier ergab sich im Gegensatz zu den bereits dargestellten Modelluntersuchungen eine wellenlängenunabhängige, konstante Streufunktion. Eine Transformationskurve nach dem Schema von Abb. 7 zeigt ebenfalls, daß es für hohe Streukoeffizienten im Fall unendlicher Schichtdicke einen annähernd linearen Bereich gibt. Diese Befunde zeigen, daß auf die Reflexionsspektren des intakten hämoglobinfrei perfundierten Gehirns die lineare Mehrkomponentenanalyse angewandt werden kann (B.2.4.2.). Dies gilt jedoch nicht für Gehirnhomogenate oder Gehirnschnitte. Die Ermittlung des jeweiligen Redox-Zustandes der Cytochrome während der Perfusion und nach Perfusionsstop kann daher durch entsprechende Superposition vollständig oxidierter und vollständig reduzierter Bezugsspektren erfolgen. Die Abbildung der zugehörigen Fehlerfunktion rechtfertigt diese Auswertungsmethode (Abb. 73).

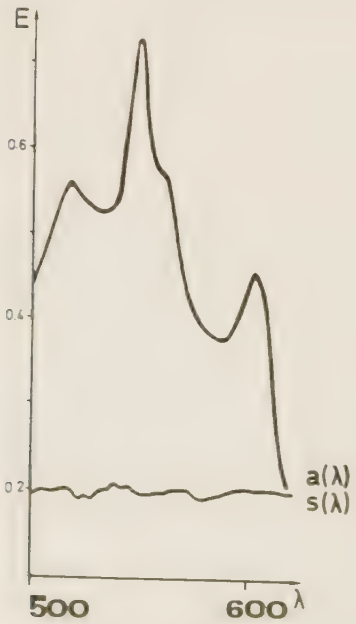


Abb. 72: Auftrennung des wahren Absorptionsspektrums a (λ) und des Streuspektrums s (λ) für das perfundierte Meerschweinchengehirn (Darstellung eines vollständig reduzierten Spektrums)

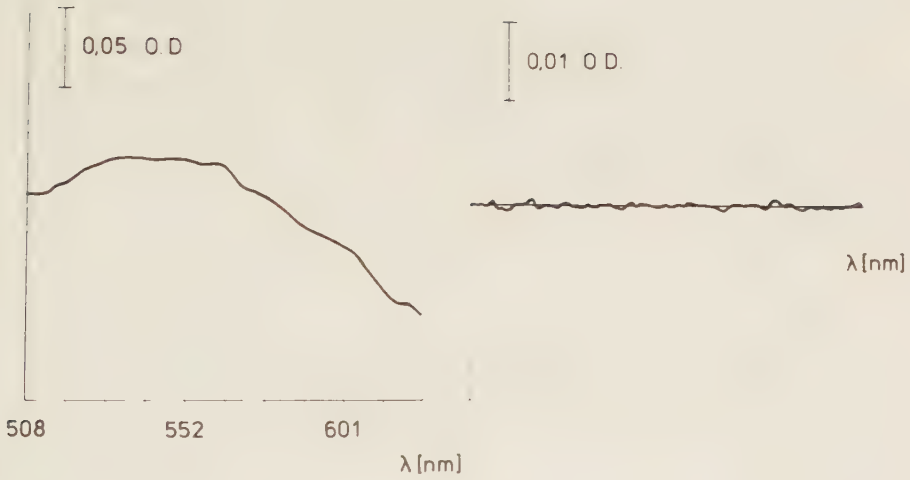


Abb. 73: Gemessenes und nach der Mehrkomponentenanalyse rückgerechnetes Spektrum eines blutfrei perfundierten Meerschweinchengehirns mit der zugehörigen Fehleraufzeichnung
(Darstellung eines vollständig oxidierten Spektrums)

Will man weitere Informationen über den Redox-Zustand der Cytochrome nach Perfusionsstop erhalten, so kann man zunächst den mittleren Oxidationsgrad aller Cytochrome bestimmen (Abb. 74). Die ansteigende Fehlerfunktion weist jedoch darauf hin, daß noch ein systematischer Fehler bei der Auswertung gemacht wird.
Erst die Bereichsauswertung zeigt, daß die Cytochrome nicht der gleichen Entsättigungskinetik folgen (Abb. 75).
Daraus ergibt sich die Folgerung, daß nur bei gleicher Kinetik aller Cytochrome eine Auswertung nach mittlerem Oxidationsgrad zulässig ist. Es hat sich daher bewährt die Fehlerfunktion zu bestimmen und auszudrucken.

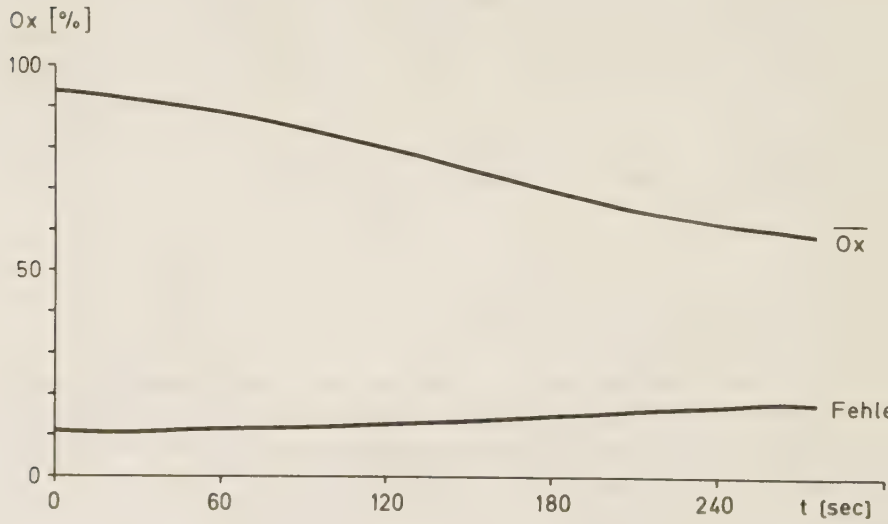


Abb. 74: Darstellung des mittleren Oxidationsgrades der Atmungskettenenzyme des hämoglobinfrei perfundierten Meerschweinchengehirns während eines Anoxiezyklus mit ensprechender Fehlerfunktion der Entsättigung

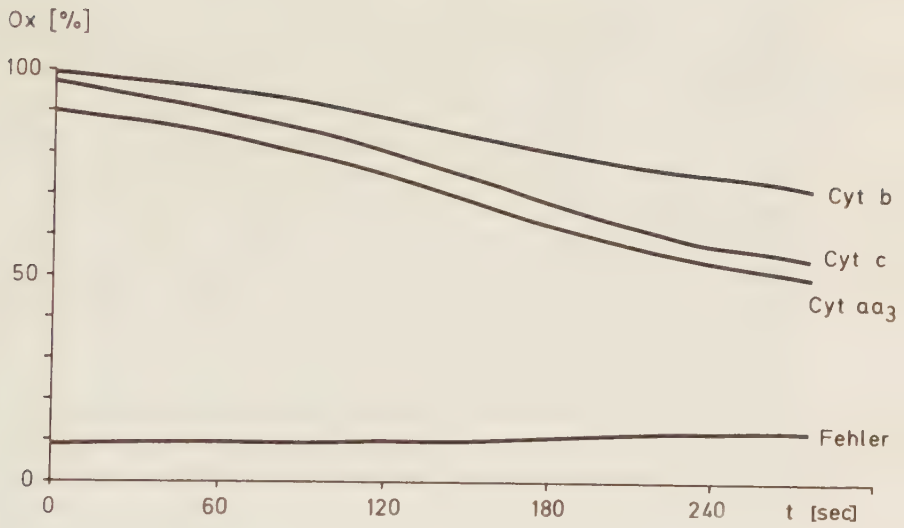


Abb. 75: Darstellung der Oxidationsgrade für die Cytochromeinzelbereiche (aa_3, b und c) des hämoglobinfrei perfundierten Meerschweinchengehirns während eines Anoxiezyklus mit entsprechender Fehlerfunktion der Entsättigungskinetik

D. DISKUSSION

Bei photometrischen Untersuchungen von Suspensionen muß die Frage geprüft werden, ob das Lambert-Beersche Gesetz noch angewandt werden kann, da hier außer Absorption noch Streuung vorkommt.
Bei trüben Lösungen mit endlichen Schichtdicken ist es relativ einfach durch Zumischen eines Farbstoffes zu untersuchen, in welchem Konzentrationsbereich das Lambert-Beersche Gesetz gültig ist.
L.M.N. Duysens (56-58) stellte fest, daß sich die Absorptionsspektren seiner trüben Lösungen abflachten. Er erklärt diese Abflachung durch die gegenseitige Beschattung der Teilchen und gibt eine quantitative Theorie dieses Effektes wieder, aus der die optische Dichte der Teilchen berechnet werden kann. Diese optische Dichte dient als Grundlage zur Berechnung des wahren Absorptionsspektrums einer Suspension. Er fand für niedere Konzentrationen, daß die Streuung proportional der Anzahl der Streupartikel in einem bestimmten Volumen ist. Die Darstellung für höhere Suspensionskonzentrationen ergibt leicht gekrümmte Kurven mit einer Rechtsverschiebung ausgehend von der Ordinate. Sie zeigen einen ähnlichen Verlauf, wie die in dieser Arbeit vorgestellten Transformationskurven zwischen einem Reflexionsspektrum und einem Transmissionsspektrum (vergl. B.2.4.1., Abb. 4). Lübbers und Wodick (47-52) wiesen darauf hin, daß die Farbstoffverteilung auch einen wesentlichen Effekt auf das Absorptionsspektrum hat. Bei inhomogener Verteilung kommt es ebenfalls zu einer Abflachung des Absorptionsspektrums.

In der Praxis wird zur Auswertung vor allem das Zwei-Wellenlängenverfahren (Kramer 74, Millikan 75, Chance 6, 7) angewandt. Bei isolierten Mitochondrien werden die beiden Wellenlängen so gewählt, daß die Redoxänderungen bei der einen Wellenlänge maximal, bei der anderen (isosbestische Wellenlänge) vernachlässigbar sind. Hierfür muß jedoch untersucht

werden, ob die in klaren Lösungen ermittelten Werte für die molaren Extinktionskoeffizienten auch für trübe Lösungen angewandt werden dürfen.
Von Chance (6, 7) wurde beschrieben, daß sich Konzentrationen und Redoxverhältnisse unter seinen Meßbedingungen, im durchfallenden Licht, mit ausreichender Genauigkeit bestimmen lassen. Es gibt jedoch keine systematischen Untersuchungen darüber, ob dies auch für Reflexionsspektren gilt.

Lübbers und Wodick (47) konnten zeigen, daß die Reflexionsspektren eines durchbluteten Organs vorwiegend durch das Spektrum des Hämoglobins geprägt sind. Untersuchungen an der durchbluteten Haut zeigten, daß zwei Faktoren die Spektren verformen:
1. eine inhomogene Verteilung des Hämoglobins im Gewebe und
2. eine wellenlängenabhängige Rückstreuung.
Die inhomogene Verteilung ließ sich durch ein neuartiges Verfahren - die Queranalyse (48, 49) berücksichtigen, während das Problem der wellenlängenabhängigen Rückstreuung noch nicht befriedigend gelöst war.

Über Lichtstreuung gibt es umfangreiche Literatur. Meißt wird untersucht, wie man den genauen Zusammenhang zwischen optischen Eigenschaften und Partikelgröße in Gleichungssysteme fassen kann.
Diesen Weg haben wir nicht gewählt, weil
1. die Partikelgrößen, die für die Streuung verantwortlich sind, in einem Organ außerordentlich variieren. Es ist sogar fraglich, ob es charakteristische Partikelverteilungskurven gibt;
2. weil die Zahl der Parameter, die bei Reflexionsspektren von Organen meßbar sind, sehr beschränkt ist.

Die praktische Anwendung komplexer Formeln ist daher nicht möglich.

Die einfachste - aber durchaus in der Praxis bewährte - Theorie zur Auswertung von Reflexionsspektren ist die Zwei-Fluß-Theorie von Kubelka und Munk (42, 43).

Kubelka und Munk nahmen an, daß sich ein Medium durch zwei Konstanten charakterisieren läßt, - durch den Absorptionskoeffizienten a (λ) und den Streukoeffizienten s (λ). Von diesen beiden Konstanten ausgehend, berechneten sie bei bekannter Schichtdicke (d) ein Transmissions- und ein Reflexionsspektrum.

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, daß der Ansatz von Kubelka und Munk durch einen Kunstgriff benutzt werden kann, um das wahre Absorptionsspektrum und das Streuspektrum einer Suspension zu bestimmen. Werden von einer gleichen Meßprobe sowohl Transmissionsspektrum als auch Reflexionsspektrum bestimmt, so erhält man aus diesem Spektrenpaar zwei voneinander unabhängige Informationen, die es erlauben a (λ) und s (λ) zu errechnen.
Um die Zwei-Fluß-Theorie auf diese Transmissions- und Reflexionsspektren anwenden zu können, mußte jedoch zunächst eine Anpassung auf unsere spezielle Problemstellung erfolgen. Dies wurde von F. Hannebauer und J. Hoffmann (Max-Planck-Institut für Systemphysiologie) durchgeführt, indem sie eine Umkehrung des Auswertungsvorganges vornahmen.
Diese Umkehrung ist möglich, wenn folgende Randbedingungen eingehalten werden. Sie lauten:

a) Meßküvette ist nur von einer Seite beleuchtet
b) Rückseite der Küvette ist im reflektierten Licht mit einer "ideal weißen Fläche" abgedeckt.

Bei der Zwei-Fluß-Theorie wird in Annäherung der tatsächlichen Verhältnisse statt einer beliebigen Winkelverteilung von gestreutem Licht, nur eine Richtungsänderung in Vorwärts- oder Rückwärtsrichtung angenommen.
Es zeigte sich, daß trotz der Beschränkung auf diese beiden Richtungen die tatsächlichen Verhältnisse erstaunlich gut wiedergegeben werden, so daß es nicht nötig erscheint, kompliziertere Theorien heranzuziehen (77).
Zur Veranschaulichung der Auswirkung der Streuung, wurden in Analogie zu Lübbers und Wodick (47-52) Transformationen gezeichnet. Wie Abbildung 4, Kapitel 2.4.1., deutlich macht, kann bereits aus einer Transformationsdarstellung zwischen

einem Reflexions- und Transmissionsspektrum die Größe von Absorption und Streuung abgelesen werden. Diese Darstellung zeigt weiterhin, daß bei steigendem Streukoeffizienten die erhaltenen Kurven sich immer weiter von der Linearität entfernen, d.h. deutlich gekrümmter werden und von dem Nullpunkt aus nach rechts verschoben sind.

Um den Einfluß der Streuung quantitativ zu erfassen, wurden systematische Untersuchungen an Modellen durchgeführt, mit denen schrittweise die komplizierten Verhältnisse im Gewebe angenähert wurden. Bei der einen Versuchsreihe wurden zu Kapseln, Gehirnmitochondrien und Gehirnhomogenaten oxygeniertes Hämoglobin zugesetzt. Da die Eigenabsorption der Mitochondrien und der Homogenate klein gegenüber der Absorption des Hämoglobins war, befanden sich in diesem Fall Streuteilchen in nicht streuender aber absorbierender Lösung.

Dabei zeigte sich, wie erwartet, daß das Lambert-Beer Gesetz nur für klare Lösungen gilt, d.h., für Fälle in denen die Streuung vernachlässigt werden kann.

Tritt jedoch Streuung auf, wie z.B. bei Suspensionen, wo Einzelpartikel gleichmäßig in einem Medium verteilt sind, so verformt solche Streuung die Spektren.

In dem untersuchten Bereich findet man zwar noch lineare Eichkurven, die aber in ihrer Steilheit und dem Nulldurchgang verändert sind (C.2.2.).

Die Meßserie an biologischen Komponenten (C.2.3.) unterschied sich von den oben genannten Versuchen dadurch, daß hier streuende und absorbierende Eigenschaften nicht voneinander getrennt erfolgen, d.h. für die Absorption und die Streuung sind die Mitochondrien der biologischen Komponenten verantwortlich. Um die relativ schwachen Absorptionssignale der Cytochrome stärker hervorzuheben, wurde die Konzentration der Suspensionen erhöht - bei gleichzeitiger Verminderung der Schichtdicke auf d = 1 mm.

Die Auswertung nach der Zwei-Fluß-Theorie führte in allen Fällen zur Auftrennung der wahren Absorptionsspektren und der zugehörigen Streuspektren.

Nachdem gezeigt werden konnte, das die vorgestellte Auswertungsmethode an Modelluntersuchungen mit Farbstoffzugabe (C.2.2.) und an Suspensionen biologischer Komponenten und an Gehirnschnitten (C.2.3.) anwendbar ist, wurde geprüft, ob dies auch für das intakte Organ gilt.

Im Gegensatz zu den oben genannten Messungen, liegt das Problem vor, daß sich im Gewebe keine Transmissionsspektren aufnehmen lassen. Für die Auswertung nach der Zwei-Fluß-Theorie von Kubelka und Munk wird aber von der gleichen Probe ein Spektrenpaar - das Transmissions- und das Reflexionsspektrum benötigt. Hier helfen zusätzliche Informationen, wie die Grundspektren der reinen Cytochrome sowie Streuspektren von Gehirnschnitten weiter.

Vergleicht man ein Gewebespektrum mit einem streuungsfreien Küvettenspektrum der reinen Cytochrome (Abb. 76), so findet man in Analogie zu dem bereits diskutierten Phänomen der Abflachung (Lübbers und Wodick 47-52 und Duysens 56-58), ebenfalls ein deutlich flacheres Signal des Gewebespektrums.

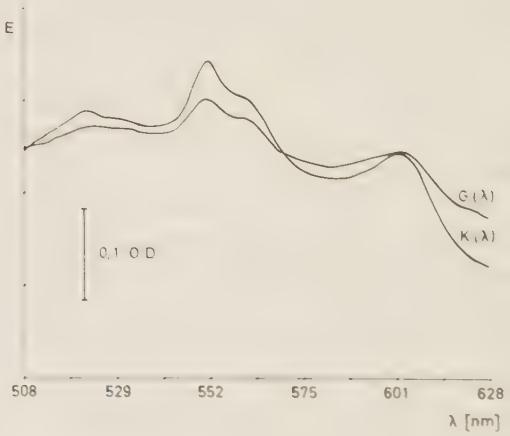


Abb. 76: Gemessenes Reflexionsspektrum reduzierter Cytochrome des blutfrei perfundierten Meerschweinchengehirns und zusammengesetztes Reflexionsspektrum aus reinen Cytochromlösungen des gleichen Konzentrationsverhältnisses.

Zur genauen Analyse dieser Deformation wurden die jeweiligen Extinktionen gleicher Wellenlänge gegeneinander aufgetragen und man erhält die dargestellte Transformationskurve (Abb. 77).

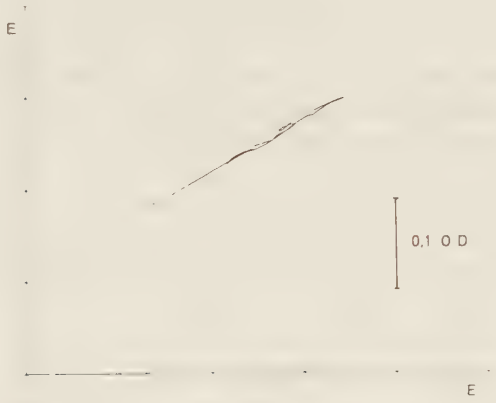


Abb. 77: Transformationskurve zwischen einem Gewebespektrum (perfundiertes Meerschweinchengehirn) und einem Küvettenspektrum (reines Cytochromspektrum)

Der Vergleich dieser Transformationskurve mit den errechneten Transformationen zur Bestimmung von Absorptions- und Streukoeffizienten für den Fall unendlicher Schichtdicke (Abb. 5, B.2.4.2.) erlaubt eine Interpretation dieser Darstellung. Man findet bei dem hämoglobinfrei perfundierten Gehirn über den gesamten Wellenlängenbereich von 510 - 630 nmn einen konstanten, d.h. wellenlängenunabhängigen Streukoeffizienten, der zu einer Verzerrung bzw. Abflachung der Maxima des Gewebespektrums führt. Die günstigen Reflexionsbedingungen des intakten, weißen blutfrei perfundierten Gehirns sind die Ursache für diese konstante Streuung.

Dieses Ergebnis erlaubt die Anwendung der linearen Mehrkomponentenanalyse (C.2.4.1., Abb. 73). Sie ermöglicht mittels vollständig oxidierter und reduzierter Bezugsspektren den mittleren Oxidationsgrad der Cytochrome der Atmungskette zu errechnen (Abb. 74).
Die Fehleranalyse dieser Auswertung zeigt [illegible], daß diese Cytochrome nicht exakt der gleichen Kinetik folgen.

Die Bereichsauftrennung in verschiedene Wellenlängenausschnitte zeigt bei Anoxieversuchen die unterschiedlichen Sättigungskinetiken der Cytochrome (Abb. 75).

Untersuchungen von Chance [6, 7] an isolierten Mitochondrien haben gezeigt, daß sich die Redoxzustände der Atmungsenzyme bei verschiedenen Stoffwechselbedingungen deutlich verändern.

Status	limitierende Substanz	Prozentuale Reduktion der Komponenten a	c	b	Flavoprotein	NADH
3 (aktiver Zustand)	Atmungskette	4	6	[illegible]6	20	[illegible]
4 (Ruhezustand)	ADP	0	[illegible]4	35	4[illegible]	[illegible]9
5	Sauerstoff	[illegible]00	[illegible]00	[illegible]0	[illegible]	[illegible]

Tabelle 3: Redoxverhältnis der Atmungskette bei isolierten Mitochondrien, nach Chance und Williams [7]

Man sieht, daß die Cytochrome nur dann vollständig reduziert werden, wenn der Sauerstoff zum limitierenden Faktor wird (Hypoxie).
Solange genügend Sauerstoff vorhanden ist, können andere Substanzen limitierend wirken, wie z.B. im Ruhezustand das ADP.
Wird jedoch durch vermehrte Zellarbeit reichlich ADP angeliefert, so werden die Cytochrome stärker oxidiert. Es konnte gezeigt werden, daß der Sauerstoff bei isolierten Mitochondrien erst bei sehr niedrigen Sauerstoffdrucken zur Reduktion führt (Schindler, Chance 76, Starlinger, Lübbers 39, 40). Oberhalb dieses Druckes sollte die Redoxkinetik nicht beeinflußt werden.

Wilson (53-55) fand aber schon Veränderungen des Cytochroms c bei sehr viel höheren Sauerstoffdrucken, obwohl die O_2-Aufnahme unverändert blieb. Wenn sich diese Befunde bestätigen, könnte die Atmungskette in einem großen Bereich als Sauerstoffsensor fungieren. Die Versuche sind jedoch nach der Zwei-Wellenlängenmethode ausgewertet, daher sollten die Versuche mit einer besseren Auswertungstechnik wiederholt werden, bevor zu weitgehende Schlüsse gezogen werden.

Ähnliches dürfte für die Versuche von Jöbsis (66-73) gelten. Die Arbeitsgruppe um Jöbsis findet, daß die Redoxverhältnisse der Atmungskette in vivo nicht den Verhältnisse entsprechen, wie sie an isolierten Mitochondrien gefunden werden.
Er beobachtet bei Normoxie eine Reduktion des Cytochroms aa_3 von 85%, die sich nach Atmung O_2-reicher Gasgemische verkleinerte.
Durch die Erarbeitung einer Auswertungsmethode der Zwei-Fluß-Theorie nach Kubelka und Munk, die es erlaubt Extinktionsspektren sowohl von Meßproben endlicher Schichtdicke als auch intakter Gewebe unendlicher Schichtdicke in ihre "Grundeigenschaften" zu zerlegen und quantitativ zu analysieren, ist es nun möglich, in weiteren Versuchen eine Anwendung der Auswertungsmethode auf in vivo Versuche unter "Normalbedingungen" fortzuführen.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine Auswertungsmethode zu prüfen, mit der es möglich ist, genaue Aussagen über das "wahre" Absorptionsverhalten und den Einfluß der Streuung zu erhalten (78).

Hierfür wurde die Zwei-Fluß-Theorie nach Kubelka und Munk (42, 43) herangezogen, die die Auftrennung von Absorptions- und Streuspektren einer Suspension erlaubt.
Ausgehend von Messungen in klaren Lösungen, wo der Fall "Streuung gleich Null" vorliegt, wurde eine Meßanordnung zusammengestellt, die sich allmählich den Verhältnissen in dem intakten Organ annähern sollte.
Nach der Prüfung dieser Auswertungsmethode an biologischen Komponenten konnte die Anwendung für auf in vivo-Messungen erfolgen.
Aufgrund der zuvor gewonnenen Erkenntnisse konnten auch hier die Absorptions- und Streukoeffizienten ermittelt werden und damit Aussagen über Oxidationsgrade während der Gehirnperfusion und nach Perfusionsstop, sowie über das Redoxverhalten der einzelnen Cytochrome gemacht werden.

E.1. Untersuchungen an klaren Lösungen

Die Untersuchungen an klaren Lösungen bildeten die Grundlage für die mathematische Auswertung biologischer Meßreihen. Es wurden hierzu "Grundspektren" von isolierten Cytochromen im oxidierten und reduzierten Zustand in 1 cm-Küvetten im durchfallenden und im reflektierten Licht mit dem Rapidspektrometer T 13/3 aufgenommen.

Vergleichende Messungen von oxygeniertem und desoxygeniertem Hämoglobin und Myoglobin schlossen sich an.

E.2. Untersuchungen an Gehirnmitochondrien

Im Rahmen der schrittweisen Annäherung der Verhältnisse im intakten Organ wurden hier die Absorptionsbanden der Cytochrome in den Mitochondrienmembranen gemessen. Der Meßbereich lag zwischen 510 - 630 nm. Die Aufnahmen erfolgten in Küvetten verschiedener Schichtdicke, und die Daten lieferten durch Anwendung der Zwei-Fluß-Theorie eine Auftrennung von "wahren" Absorptionsspektren und zugehörigen Streuspektren.

E.3. Untersuchungen an Gehirnhomogenaten

In Analogie zu der Versuchsreihe an Gehirnmitochondrien, wurden an Homogenatsuspensionen Reflexions- und Transmissionsmessungen in Küvetten verschiedenener Schichtdicke durchgeführt. Es lagen hierbei Streupartikel zwischen 1 - 30/um vor. Die Anwendung der Zwei-Fluß-Theorie zeigte auch hier in der Auftrennung von Absorption und Streuung den starken Einfluß der Streukomponente, die das gemessene Spektrum überlagert.

E.4. Simulierte Modellspektren mit Polyacrylamidkapseln

In diesen Messungen wurde die Abhängigkeit der Streuung von Partikelgrößen und Konzentration getestet. Hierzu dienten

Eichreihen von Polyacrylamidkapseln verschiedener Durchmesser (0,2/um, 5/um, 30/um), denen Hämoglobinlösungen in steigenden Konzentrationen zugesetzt wurden. Es lagen hier streuende aber nicht absorbierende Partikel in einem absorbierenden aber nicht streuenden Medium vor. Bei diesen simulierten Messungen waren die Versuchsbedingungen optimal voneinander abgegrenzt, sodaß die Auswertungsmethode unter verschiedensten Streubedingungen geprüft werden konnte.

E.5. Untersuchungen am perfundierten Meerschweinchengehirn

Nach den genannten Voruntersuchungen erfolgte hier die Anwendung der Zwei-Fluß-Theorie auf in vivo Messungen. Als Meßobjekt diente das Meerschweinchengehirn, das, um den störenden Einfluß des Hämoglobinspektrums auszuschalten, mit einer Macrodexlösung blutfrei perfundiert worden war. Die Messungen fanden unter Hypothermiebedingungen statt (18°C), um eine ausreichende Sauerstoffversorgung des Gehirns zu gewährleisten.
Erste Untersuchungen an Gehirnschnitten von einer Schichtdicke von 500/um ließen Transmissions- und Reflexionsmessungen und damit die unmittelbare Auswertung zu. Anschließende Versuche am intakten, perfundierten Gehirn erlaubten jedoch ausschließlich Reflexionsmessungen. Die benötigen Informationen konnten aufgrund gesammelter Daten der Grundspektren der Cytochrome, sowie des Streuverhaltens von Gehirnschnitten auch hier zu einer Auftrennung von Absorptionsspektrum und Streuspektrum führen. Diese Auswertung erlaubte Aussagen über den mittleren Oxdationsgrad der Cytochrome unter Perfusionsbedingungen, sowie detaillierte Angaben über den Redoxzustand der einzelnen Atmungskettenkomponenten, die wiederum Rückschlüsse auf die Stoffwechselaktivität der betreffenden Organe zulassen.

F. LITERATURVERZEICHNIS

1. Lehninger, A.L.:
The Mitochondrion.
Benjamin W.A. Press, New York 1965.

2. Palade, G.E.:
Enzymes: Units of Biological Sturcture and Function.
O.H. Gaebler (ed.), p. 185, Academic Press, New York and London 1956.

3. Palade, G.E.:
The fine structure of mitochondria.
Anat. Record. 114, 427 (1952).

4. Parsons, D.F.:
Recent advances correlating structure and function of mitochondria.
Int. Rev. Exp. Pathol. 4, 1 (1965).

5. Fernandéz-Morán, H.:
Cell-membrane ultrastructure.
Circulation 26, 1039 (1962).

6. Chance, B.:
Spectrophotometry of intracellular respiratory pigments.
Science, 120, 767 (1954).

7. Chance, B., Williams, G.R.:
The respiratory chain and oxidative phosphorylation.
Adv. Enzym. 17, 65 (1956).

8. Chance, B.:
Techniques of the respiratory enzymes.
Methods in Enzymology IV, Academic Press, New York, S. 273, (1957).

9. Slater, E.S.:
Oxidative phosphorylation.
Rev. Pure Appl. Chem., 8, 221 (1958).

10. Lardy, H.A., Ferguson, S.M.:
Oxidative phosphorylation in mitochondria.
Ann. Rev. Biochem. 38, 991 (1969).

11. Mitchell, P.:
Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation.
Biol. Rev. 41, 445 (1965).

12. Mitchell, P., Moyle, J.:
Evidence discriminating between the chemical and the chemiosmotic mechanisms of electron transport phosphorylation.
Nature, 208, 1205 (1965).

13. Mitchell, P.:
Translocations through natural membranes.
Adv. Enzym. 29, 33 (1967).

14. Mitchell, P.:
Keilin's Respiratory Chain Concept and its Chemiosmotic Consequences.
Science 206, 1148 (1979).

15. Boyer, P.C.:
Role of conformational changes in energy transduction. Oxidases and related redoxe systems.
2, 994 (1964).

16. Lübbers, D.W., Niesel, W.:
Der Kurzzeit-Spektralanalysator: Ein schnell arbeitendes Spektralphotometer zur laufenden Messung von Absorptions- beziehungsweise Extinktionsspektren.
Pflügers Arch. ges. Physiol. 268, 286 (1959).

17. Lübbers, D.W., Niesel, W.:
Über die Auswertung von spektralen Veränderung in biologischen Objekten.
Naturwiss. 44, 59 (1957).

18. Lübbers D.W., Niesel W.:
Ein Kurzzeit- Spektralanalysator zur Registrierung rasch verlaufender Änderungen der Absorption.
Naturwiss. 44, 60 (1957).

19. Lübbers, D.W., Niesel, W., Schneewolf, D., Richter, J., Botticher, W.:
Double Beam Spectrometer with 10 msec Recording Time.
Rev. Sci. Ins. 35, 578 (1964).

20. Wodick, R.:
Die Auswertung von Mehrkomponentensystemen der Kurzzeitspektophotometrie.
Dissertation, Marburg 1968.

21. Wodick, R.:
Neue Auswertverfahren für Reflexionsspektren und Spektren inhomogener Farbstoffverteilung, dargestellt am Beispiel von Hämoglobinspektren.
Dissertation, Marburg 1971.

22. Clark, J.B., Nicklas, W.Y.:
The metabolism of brain mitochondria.
J. Biol. Chem. 245, 4724 (1970).

23. Mela, L.:
Adv. Exp. Med. Biol. 78, 371 (1977).

24. Knaust, K.:
Sauerstoffversorgung des hämoglobinfrei perfundierten Meerschweinchengehirns bei Normo- und Hypothermie.
Dissertation, Marburg 1967.

25. Schwickardi, D.:
Konzentration und Kinetik der Atmungsfermente am isoliert perfundierten Meerschweinchengehirn in vivo und in Hypothermie von 18°C.
Dissertation, Marburg 1968.

26. Birrenbach, G.:
Über Mizellpolymerisate, mögliche Einschlussverbindungen (Nanokapseln) und deren Eignung als Adjuvantien.
Dissertation, Zürich 1973.

27. Opitz, N., Steinmann, W., Lübbers, D.W.:
unveröffentliche Ergebnisse.

28. Buse, G., Steffens, G.:
Studien an Cytochrom c - Oxidase I.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 1125 (1976).

29. Buse, G., Steffens, G.:
Studies on Cytochrom c - Oxidase II.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 359, 1005 (1978).

30. Buse, G., Steffens, G.:
Studies on Cytochrome c - Oxidase III.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 359, 1011 (1978).

31. v. Jagow, G., Schägger, H., Engel, W.D, Machleidt, W.:
Beef heart complex III: Isolation and Characterisation of Cytochrome b.
FEBS-Letters, 91, 121 (1978).

32. v. Jagow, G., Engel, W.D.:
Modell for the cytochrome b
FEBS-Letters, 111, 1 (1979).

33. Engel, W.D., Schägger, H., v. Jagow, G.:
Ubichinol-Cytochrom c - Reduktase Complex from Beef Heart Mitochondria.
Gesellschaft für Biochemische Chemie, Herbsttagung 1979.
Band 360, 1141 (1979).

34. v. Jagow, G., Sebald, W.:
b-type cytochromes.
Ann. Rev. Biochem. 49, 281 (1980).

35. Richterich, R.:
Klinische Chemie, Akademische Verlagsgesellschaft, Frankfurt 1965.

36. Zierold, K.:
Rasterelektronenmikroskopie und Röntgenmikroanalyse an Gefrierbrüchen von Zellen und Geweben.
Beitr. elektronenmikroskop. Direktabb. Oberge. 12/1 (1979).

37. Lowry, O.H., Rosebrough, A.L., Farr, A.L., Dall, R.J.:
Protein measurement with the Folin-Phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265 (1951).

38. Hess, B., Kleinhans, H., Schlüter, H.:
A kHz Dual Wavelenght Spectrophotometer.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 351, 515 (1970).

39. Starlinger, H., Lübbers, D.W.:
Methodische Untersuchungen zur polarographischen Messung der Atmung und des kritischen Sauerstoffdrucks bei Mitochondrien und isolierten Zellen mit der membranbedeckten Platinelektrode.
Pflügers Arch. 337, 19 (1972).

40. Starlinger, H., Lübbers, D.W.:
Polarographic measurements of the oxygen pressure performed simultaneously with optical measurements of the redox state of the respiratory chain in suspension of mitochondria under steady-state conditions at low oxygen tensions.
Pflügers Arch. 341, 15 (1973).

41. Schwarzmann, V.:
Mikrokryophotometrische Messungen von MbO_2-Sättigungsprofilen in Muskelschichten des Hühnermagens und der erleichterte O_2-Transport durch Myoglobin-Diffusion.
Dissertation, Regensburg 1978.

42. Kubelka, P., Munk, F.:
Ein Beitrag zur Optik der Farbanstriche.
Z. Techn. Physik 12, 593 (1931).

43. Kubelka, P.:
New contributions to the optics of intensely light scattering materials.
J. Opt. Soc. 44, 330 (1954).

44. Fujii, T., Kubo, S., Iwase, Y.:
Gas-blow and medium-flow method for stable recording of electrical activities in the sliced mammalian cerebral tissues in vitro.
J. Physiol. Soc. Japan 32, 333 (1970).

45. Fujii, T.:
Effects of cooling on guinea pig olfactory cortex maintained in vitro.
Electroenceph. clin. Neurophys. 43, 238 (1977).

46. Kortüm, G.:
Reflexionsspektroskopie.
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.

47. Wodick, R., Lübbers D.W.:
Ein neues Verfahren zur Bestimmung des Oxigenierungsgrades von Hämoglobinspektren bei inhomogenen Lichtwegen, erläutert an der Analyse von Spektren der menschlichen Haut.
Pflügers Arch. 342, 41 (1973).

48. Wodick, R., Lübbers D.W.:
Quantitative Analyse von Reflexionsspektren mit inhomogenen Lichtwegen an Mehrkomponentensystemen mit Hilfe der Queranalyse I.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, 903 (1973).

49. Wodick, R., Lübbers, D.W.:
Quantitative Analyse von Reflexionsspektren und anderen Spektren mit inhomogenen Lichtwegen an Mehrkomponentensystemen mit Hilfe der Queranalyse II.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, 916 (1973).

50. Wodick, R., Lübbers D.W.:
Quantitative evaluation of reflection spectra of living tissues.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem 355, 583 (1974).

51. Wodick, R., Lübbers, D.W.:
Methoden zur Bestimmung des Lichtweges bei der Photometrie trüber Lösungen oder Gewebe mit durchfallendem oder reflektiertem Licht.
Pflügers Arch. 342, 29 (1973).

52. Lübbers, D.W., Wodick, R.:
Schnelle Photometrie komplizierter biochemischer Mehrkomponentensysteme.
Z. Anal. Chem. 261, 271 (1972).

53. Wilson, D.F., Owen, C.S., Erecinska, M.:
Quantitative dependence of mitochondrial oxidative phosphorylation on oxygen concentration.
Arch. Bioch. 195, 494 (1979).

54. Wilson, D.F., Erecinska, M., Drown, D., Silver, I.A.:
The oxygen dependence of cellular energy metabolism.
Arch. Bioch. 195, 485 (1979).

55. Erecinska, M., Davis, J.S., Wilson, D.F.:
Regulation of respiration in paracoccus-denitrificans-dependence on redox state of cytochrome c and (ATP)/(ADP) (P_i).
Arch. Bioch. 197, 463 (1979).

56. Duysens, L.N.M.:
The flattening of the absorption spectrum of suspensions, as compared to that of solutions.
Bioc. Biop. A. 19, 1 (1956).

57. Duysens, L.N.M., Amesz, J.:
Fluorescence spectrophotometry of reduced phosphorydine nucleotide in intact cells in the near ultraviolet and visible region.
Bioc. Biop. A. 24, 19 (1957).

58. Duysens, L.N.M., Sweep, G.:
Fluorescence spectrophotometry of pyridine nucleotide in photosynthesizing cells.
Bioc. Biop. A 25, 13 (1957).

59. Lübbers, D.W., Wodick, R.:
Oxygen Measurements in Biology and Medicine,
Edt. by J.P. Payne, D.W. Hill,
Butterworths, London and Boston, Kap. 7, 85 (1975).

60. Karlson, P.:
Kurzes Lehrbuch der Biochemie,
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1978).

61. Katz, A.M.:
Physiology of the Heart,
Raven Press, New York.

62. Lehninger, A.L.:
Biochemie,
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. (1975).

63. Schmidt, R.F., Thews, G.:
Physiologie des Menschen,
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1980).

64. Figulla, H.R., Wodick, R., Hoffmann, J., Lübbers, D.W.:
The O_2-saturation of myoglobin and cytochrome aa_3 during high-flow hypoxia in the beating haemoglobin-free perfused Langendorf guinea-pig heart.
Pflügers Arch. 379, R 3 (1979).

65. Figulla, H.R., Hoffmann, J., Lübbers, D.W.:
unveröffentlichte Ergebnisse.

66. Kreisman, N., Sick, T., Rosenthal, M., La Manna, J.:
Relationsship between local cerebral oxygen tension and cytochrome aa_3 redox levels indicates transition from cerebral O_2 sufficiency to deficiency during recurrent seizures in the rat.
Fed. Proc. 39, 533 (1980).

67. Rosenthal, M., La Manna, J.C.:
Oxidative metabolism and electrophysiological activity in intact central nervous system.
Oxygen & Physiological Function, S. 515,
Edt. F.F. Jöbsis, Professional Information Library, Dallas, Texas (1977).

68. Peretsman, S.J., Rosenthal, M.:
Brain cytochrome aa_3 redox states measurements in situ in chronic cat preparations.
Brain Res. 128, 553, (1977).

69. Jöbsis, F.F., Rosenthal, M.:
Cerebral energy consumption and provision: the predominance of neuronal oxidative metabolism processes.
Cerebral Vascular Smooth Muscle and its Control,
Ciba Foundation Symposium 56, S. 129 (1978).

70. Bryan, R.M., Jöbsis, F.F.:
Effects of altered glycolytic flux on mitochondrial redox state in the cerebral cortex.
Fed. Proc. 39, 344 (1980).

71. Jöbsis, F.F., Rosenthal, M.:
Behaviour of the mitochondrial respiratory chain in vivo.
Cerebral Vascular Smooth Muscle and its Control,
Ciba Foundation Symposium 56, S. 149 (1978).

72. Mandel, L.J., Riddle, T.G., La Manna, J.C.:
A rapid scanning spectrometer and fluorometer for in vivo monitoring of steady-state and kintic optical properties of respiratory enzymes.
Oxygen & Physiological Function, S. 79,
Edt. F.F. Jöbsis, Professional Information Library, Dallas, Texas (1977).

73. Mandel, L.J.:
Respiratory chain function and ion transport in epithelia.
Oxygen & Physiological Function, S. 444,
Edt. F.F. Jöbsis, Professional Information Library, Dallas, Texas (1977).

74. Kramer, K.:
Fortlaufende Registrierung der Sauerstoffsättigung im Blut an uneröffneten Blutgefäßen.
Klin. Wschr. 13, 379 (1934).

75. Millikan, G.A.:
The oximeter, an instrument for measuring continuously the oxygen saturation of arterial blood in man.
Rev. Sci. Instrum. 13, 434 (1942).

76. Chance, B., Schoener, B., Schindler, F.:
The intracellular oxidation-reduction state.
In: Oxygen in the animal organism, S. 367, Edt. Dickens, F., Neil, E., Pergamon Press (1964).

77. Hannebauer, F., Lübbers, D.W.:
unveröffentlichte Ergebnisse.

78. Heinrich, U., Hoffmann, J., Lübbers, D.W., Hannebauer, F.:
Quantitative Analysis of Reflection Spectra by Simulating Experiments on Tissue,
Oxygen Transport to Tissue,
Edt. Kovach, A.G.B., Dora, E., Budapest (1980),
in Druck.

Lebenslauf

18.10.1952	geboren in Frankfurt am Main
1959 - 1972	Besuch der Grundschule und des Gymnasiums
Juni 1972	Reifeprüfung am naturwissenschaftlichen Zweig der Elisabethenschule in Frankfurt
1972 - 1974	Studium der Biologie an der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität in Frankfurt
Sept. 1974	Diplom-Vorprüfung für Biologen in den Fächern Zoologie, Botanik, Organische Chemie und Physik
1974 - 1976	Hauptstudium an der Universität Düsseldorf
Juli 1976	Diplomhauptprüfung in Physiologischer Chemie, Pharmakologie und Physik
Okt. 1976 - Dez. 1977	Diplomarbeit am Institut für Physiologische Chemie an der Universität Düsseldorf mit dem Thema: "Partielle Reinigung und Anreicherung des Progesteronrezeptors"
Jan. 1978	Beginn der Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Systemphysiologie in Dortmund
Mai 1978	Heirat mit dem Architekten Fritz Heinrich
seit 1978	wissenschaftliche Assistentin am Max-Planck-Institut für Systemphysiologie in Dortmund

Dank

Herrn Prof. Dr. D.W. Lübbers, dem Direktor des Max-Planck-Institutes für Systemphysiologie in Dortmund, danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas meiner Dissertation und für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes.
Die zahlreichen Anregungen und förderlichen Diskussionen waren eine wertvolle Unterstützung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. H. Langer, Institut für Tierphysiologie an der Ruhr-Universität Bochum, gilt mein Dank für sein Interesse und die Betreuung der Arbeit.

Herrn Dipl. Phys. J. Hoffmann, Herrn Dr. Hannebauer und Herrn Prof. Dr. Dr. R. Wodick danke ich für die Zusammenarbeit bei den theoretischen Berechnungen der Messungen.

Der Abteilung für Datenverarbeitung des Max-Planck-Institutes für Systemphysiologie danke ich für die Erstellung der Programme und die Auswertung der Meßdaten, sowie Herrn E. Piontek und Herrn F. Keinemann für die Betreuung des Photometers.

Für die Anfertigung zahlreicher Zeichnungen danke ich Frau H. Grisar sowie Frl. D. Mägdefessel für die Schreibarbeit und Frau B. Näther und Herrn F. Sieland für die Durchführung fotographischer Arbeiten.

Weiterhin möchte ich allen Mitarbeitern des Institutes sowie ganz besonders Frau H. Sauerwald für die technische Unterstützung danken.